



**Etude et modélisation de la biosorption des métaux par  
les bactéries. Application au transfert du cadmium et  
du zinc, seuls ou en mélange par Escherichia coli et  
Cupriavidus metallidurans en colonnes de sable  
d'Hostun**

Aurélien Desaunay

► **To cite this version:**

Aurélien Desaunay. Etude et modélisation de la biosorption des métaux par les bactéries. Application au transfert du cadmium et du zinc, seuls ou en mélange par Escherichia coli et Cupriavidus metallidurans en colonnes de sable d'Hostun. Sciences de la Terre. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENU049 . tel-00716409

**HAL Id: tel-00716409**

**<https://theses.hal.science/tel-00716409>**

Submitted on 10 Jul 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THÈSE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE**

Spécialité : **Océan, Atmosphère, Hydrologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Aurélien DESAUNAY**

Thèse dirigée par **Jean MARTINS**

préparée au sein du **Laboratoire d'étude des Transferts en**

**Hydrologie et Environnement**

**Ecole Doctorale Terre-Univers-Environnement**

**Etude et modélisation de la biosorption des métaux par les bactéries. Application au transfert du cadmium et du zinc, seuls ou en mélange, par *Escherichia coli* et *Cupriavidus metallidurans* en colonnes de sable d'Hostun.**

Thèse soutenue publiquement le **21 Octobre 2011**,

devant le jury composé de :

**Mme Laura SIGG**

Professeur, Laboratoire EAWAG, Dübendorf, Suisse, Rapporteur.

**M. François LAFOLIE**

CR1-INRA, HDR, UMR EMMAH, Avignon, Rapporteur.

**M. Jean-Paul GAUDET**

IRHC-Grenoble Université, Laboratoire LTHE, Grenoble, Examineur.

**M. Franz BRUCKERT**

Professeur, Laboratoire LMGP, Grenoble, Examineur.

**M. Bruno COMBOURIEU**

Professeur, Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Lyon, Examineur.

**M. Jean MARTINS**

CR1-CNRS, HDR, Laboratoire LTHE, Grenoble, Directeur de thèse.





## **REMERCIEMENTS**

Trois ans passés au sein du LTHE pour mener à bien ce travail de thèse. Trois ans de travail mais également et surtout trois ans de partage et de bons moments avec les nombreuses personnes qui m'ont aidés à mener à terme cette expérience. Afin de rester dans le thème, ces 3 ans de thèse peuvent être comparés à une expérience de transport en milieux poreux avec ses nombreux grains et problèmes qui nous ralentissent et/ou nous retiennent. Mais comme dans les colonnes, on peut compter sur l'aide de nombreuses personnes (je ne me permettrais pas de les appeler colloïdes) qui permettent de mener à bien cette expérience enrichissante et passionnante.

Je pense en particulier à mon directeur de thèse, Jean Martins, qui m'a fait confiance pour cette thèse. Je le remercie en particulier pour sa disponibilité et pour tout le temps qu'il a bien voulu m'accorder, parfois au détriment de sa vie personnelle. Si la thèse s'est si bien déroulée pour moi, c'est notamment grâce à Jean, à ses qualités de pédagogues et à ses nombreux conseils toujours utiles et précieux. De plus, j'ai partagé avec Jean de bons moments en dehors du laboratoire et en particulier sur les terrains de foot où en plus d'être un bon directeur de thèse, Jean s'est également avéré être un bon footballeur et notamment un excellent gardien de but, ce qui nous a permis de remporter le tournoi de foot interlabo. Un grand merci à Jean pour son soutien lors de ces 3 années.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir pris du temps pour évaluer ce travail. Je souhaite remercier plus particulièrement les deux rapporteurs : Laura Sigg et Francois Lafolie . Je n'oublie pas non plus les examinateurs de ce travail : Bruno Combourieu, Franz Bruckert et Jean-Paul Gaudet pour les remarques constructives qui ont suivis la soutenance et qui m'ont conforté dans mon envie de poursuivre les travaux commencé lors de cette thèse.

Je souhaite également remercier, les gens qui ont participé de prêt à ce travail et dont les remarques et suggestions m'ont permis d'avancer. Je pense en particulier à Lorenzo Spadini qui a suivi ce travail et m'a fait découvrir les joies et complexités de la géochimie mais également permis de me familiariser à la modélisation avec PhreeqC. Je pense également à Jean-Paul Gaudet pour ses remarques pertinentes notamment pour tout ce qui concerne le transport en colonnes. J'en profite pour remercier fortement Elsa Vitorge qui m'a initié au plaisir des études en colonnes de laboratoire ainsi que Sylvie qui m'a permis de m'initier à la cytométrie en flux. Roland Helmann pour sa participation aux analyses en microscopie électronique et en particulier en cryomicroscopie.

Une pensée me vient bien évidemment pour toutes les personnes qui ont partagés mon bureau et ma science du rangement. Je pense en particulier à Aline avec qui j'ai partagé ses 3 années de thèse, ses galères mais aussi ses bons moments. Je tiens également à remercier notre Belge de service, Sylvie, et notamment ses apports en chocolats et sa bonne humeur. Je n'oublie pas non plus, nos amis brésiliens, Danilo et Andre, pour les bons moments passés ensemble, notamment de belles randonnées dans le Vercors suivis de pic-nic « copieux ». David qui bien qu'arriver tardivement au sein de mon équipe a apporté sa bonne humeur, ses talents de sportifs mais aussi son soutien pour les mots fléchés. Enfin je tiens à remercier les talents culinaires de l'équipe « microbio » du LTHE, ce qui m'a permis de ne pas manquer de sucres pendant ses 3 ans de thèse.

Erwann mérite bien un petit paragraphe pour toutes les souffrances que j'ai du infliger à ses yeux et à son sens de l'ordre. Désolé pour le bazar qui traînait (trop) souvent dans les laboratoires et merci pour ta patience. Merci aussi pour les supers randonnées partagées et les bons pic-nics d'altitude, pas toujours facile de repartir après, surtout quand on perd ses semelles.

Je remercie également les doctorants du labo, notamment tous ceux avec qui j'ai pu échanger quelques ballons, frisbee, jeux ou tout simplement de bons moments de détente autour d'un plat et d'un verre. Merci à vous tous pour votre bonne humeur et pour les bons moments passés à vos côtés, au combien précieux et indispensable pour décompresser en période de rush : Aurélien, Joris, Rémi C., Solène, Antoine, Benoit, Olivier, Adrien, Jeremy, Rémi B., Thomas, Simon, Julien, Fred, Mika... Une petite mention spéciale, à mes deux collègues (très) matinaux, Simon et Thomas, qui étaient présents dès l'aube pour m'accompagner au café du matin pendant toute la période de rédaction. Je pense également à tous mes amis extérieurs au labo avec qui j'ai partagé de nombreux moments agréables et inoubliables : Marie, Emma, Fabien, Guillaume, Angélique, Claire, Mathieu, Ben, Fred, Véro ainsi qu'à tous mes amis normands.

Enfin je tiens à remercier ma famille pour son soutien tout au long de mes années d'étudiant, cette réussite vous appartient également, un grand merci à vous pour votre soutien et votre amour.

## RESUMES

La mobilisation rapide de métaux par la fraction colloïdale et mobile des sols et en particulier par les biocolloïdes (bactéries, algues, champignons, virus, etc.) est aujourd'hui identifiée comme un important mécanisme de transport qui peut mener, dans des conditions spécifiques, au transfert massif et accéléré de polluants vers les aquifères. Pour mieux comprendre le rôle du compartiment bactérien dans le transport facilité des métaux, nous avons conduit en laboratoire une étude couplant des conditions statiques et dynamiques. Dans un premier temps, nous avons évalué la bioaccumulation du Zn et du Cd, seuls ou en mélange, par deux bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* K12DH5a et *Cupriavidus metallidurans* CH34), actives ou inactives, en caractérisant la distribution subcellulaire des métaux. Dans un second temps, nous avons évalué la mobilité de ces deux bactéries modèles, seules ou en mélange, en milieu poreux réactif, ainsi que les principaux facteurs affectant cette mobilité. Nous avons alors pu étudier la capacité de ces deux bactéries à lixivier le Zn et le Cd, seuls ou en mélange, en colonnes de sable d'Hostun préalablement contaminé à des concentrations croissantes. Dans la première partie de la thèse, nous avons développé et appliqué une méthodologie de casse cellulaire pour évaluer la distribution subcellulaire des métaux, préalablement biosorbés sur des cellules bactériennes actives ou inactives. La quantification du Zn et du Cd dans les compartiments extracellulaire, membranaire et intracellulaire des cellules a permis de montrer que les métaux sont distribués de façon inégale entre les trois compartiments cellulaires. Nous avons montré de manière originale que les métaux biosorbés sont majoritairement internalisés dans le cytoplasme, que les cellules soient actives ou non. Toutefois, l'état physiologique des cellules (actives - inactives) s'est avéré important pour les processus de prise en charge des métaux par les bactéries, puisque la bioaccumulation métallique par les bactéries actives, telles que l'on peut les observer en milieu naturel, est fortement réduite grâce à l'activation de systèmes de résistance (efflux, piégeage extracellulaire) aux métaux par les cellules bactériennes. Ces résultats montrent que l'adsorption des métaux sur la paroi des bactéries n'est qu'une première étape du processus de bioaccumulation. Par ailleurs, l'exposition des deux bactéries modèles à un mélange de Zn et de Cd a permis de montrer avec *E. coli* mais pas avec *C. metallidurans*, l'existence de phénomènes de compétition pour les sites de sorption, conduisant à une réduction de la biosorption du Zn en présence de Cd. Dans la deuxième partie de la thèse, après avoir mis au point un protocole de quantification cellulaire par cytométrie de flux, nous avons caractérisé et modélisé le transfert des deux bactéries modèles en colonnes de sable d'Hostun, sous différentes conditions de concentration et de mélange cellulaire. Nous avons ainsi montré que *E. coli* est plus mobile que *C. metallidurans*, et que l'importance du dépôt de bactéries et les mécanismes mis en jeu varient fortement avec la concentration en cellules, en relation notamment avec la géométrie du sable et notamment sa porosité. Ainsi, à très faible concentration cellulaire, condition peu étudiée en raison de difficultés techniques, les cellules sont peu retenues par le sable suggérant un risque élevé de contamination des aquifères, alors qu'à plus forte concentration, une rétention importante des cellules est observée, jusqu'à obtenir un effet de blocking, conduisant à une saturation des sites de rétention et à une forte mobilité cellulaire à très haute concentration. Finalement, nous avons pu quantifier la capacité des deux bactéries à bio-lessiver les deux métaux, seuls ou en mélange dans le sable d'Hostun, par comparaison avec le transfert des métaux sans bactéries qui s'est avéré très faible, les métaux étant fortement immobilisés par le sable. La mobilité des deux métaux a été fortement augmentée par l'injection des deux bactéries, avec un effet notablement plus important avec des cellules de *E. coli*, pourtant plus sensibles aux métaux.

A chaque étape de cette étude couplée, nous avons tenté de modéliser nos résultats. La biosorption des métaux par les bactéries a été menée avec un modèle universel à 3 sites réactifs, qui a donné des résultats très satisfaisants. Les constantes thermodynamiques de réactivité des cellules aux métaux ou avec le sable d'Hostun, ont été utilisées avec succès dans une modélisation couplée hydro-dynamique – géochimie, pour reproduire les résultats de transfert (courbes de percée et profils de rétention) des cellules et des métaux, qu'ils soient seuls ou en mélange, et de prédire correctement les flux de métaux transportés dans l'eau ou sur les biocolloïdes. Cette étude a permis de confirmer que les bactéries sont des biosorbants forts des métaux et de montrer que, au moins dans nos conditions, le processus de transport facilité des métaux par les bactéries peut largement dominer leur transport dissous, tel qu'il est encore classiquement considéré dans les sols naturels.

**Mots clés :** Bactérie, métaux lourds, internalisation, sorption, transport en milieu poreux, biolixiviation.



Recent field observations have demonstrated that supposedly poorly mobile metals can be detected at long distances from their source, highlighting the importance of poorly predicted transport processes. The fast mobilisation of metals by the colloidal and mobile fraction of soils and in particular biotic colloids (bacteria, algae, fungi, virus, etc.), is now identified as an important secondary transport process that can lead, under specific conditions, to accelerated and potentially dominant pollutant transfer towards aquifers. In order to better understand the role of the bacterial compartment of soils to metal leaching, we conducted a coupled study under static and dynamic conditions. Firstly we evaluated Zn and Cd metal biosorption onto active or inactive Gram negative bacteria (*Escherichia coli* and *Cupriavidus metallidurans* CH34) by characterizing the sub-cellular distribution of the metals through a cell disruption approach. The quantification of Zn and Cd in extracellular, membrane and cytoplasm compartments of the cells permitted to show that metals are unequally distributed between the three cell compartments and also between the two bacteria. Surprisingly, metals internalization appeared to be the dominant accumulation process of metals (high cytoplasm contents). The physiological state of the cells was also shown to be important in metal management by the bacteria, since metal accumulation in active cells was reduced due to enhanced efflux and/or EPS production mechanisms. These results suggest bacteria can internalize important amounts of heavy metals and also that adsorption onto cell surface is only a first step in metal management by bacteria. The so-determined thermo-dynamic reactivity constants were used to fit metal breakthrough curves performed in natural sand columns. The transport experiments of bacterial cells, metals or mixtures of bacteria and/or metals performed in the second part of the study, demonstrated that bacteria are able to accelerate the in situ mobilization of Cd and Zn retained in natural sand columns. This transport process was shown to be dominant upon aqueous transport and was correctly fitted using a combined transfer and geochemical modelling approach. Altogether, these results showed that, under specific conditions, heavy metal transport by bacterial cells can dominate aqueous transport processes in soils

**Key words:** Bacteria, heavy metals, internalisation, sorption, transport in porous media, bioleaching

# **TABLE DES MATIERES**

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>- iii -</b>
<b>RESUMES.....</b>	<b>- vi -</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>- ix -</b>
<b>TABLES DES FIGURES.....</b>	<b>- xiv -</b>
<b>TABLES DES TABLEAUX.....</b>	<b>- xxi -</b>
<b>ABREVIATIONS UTILISES.....</b>	<b>- xxiv -</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>- I -</b>
<b>CHAPITRE I – Introduction générale et objectifs .....</b>	<b>- 7 -</b>
<b>I-1. Milieu poreux et colloïdes.....</b>	<b>- 9 -</b>
I-1-1. Définitions et origine des colloïdes .....	- 9 -
I-1-2. Les colloïdes bactériens .....	- 10 -
I-1-3. Propriétés de surface des bactéries .....	- 11 -
I-1-3-1. Structure et géométrie des bactéries .....	- 11 -
I-1-3-2. Hydrophobie et charge de surface .....	- 13 -
<b>I-2. Réactivité des bactéries vis-à-vis des éléments traces .....</b>	<b>- 13 -</b>
I-2-1. Les éléments traces métalliques (ETM) dans l'environnement.....	- 13 -
I-2-2. Interactions entre les bactéries et les métaux dans l'environnement .....	- 15 -
I-2-2-1. Généralités .....	- 15 -
I-2-2-2. Réactivité des bactéries vis à vis des métaux.....	- 16 -
I-2-3. Stratégies de survie des bactéries résistantes.....	- 21 -
I-2-4. Les substances polymériques extracellulaires (EPS).....	- 23 -
I-2-4-1. Généralités .....	- 23 -
I-2-4-2. Les EPS et la bioremédiation.....	- 25 -
<b>I-3. Métabolisme du Zn et du Cd chez les bactéries .....</b>	<b>- 26 -</b>
I-3-1. Métabolisme du zinc chez les bactéries.....	- 26 -
I-3-2. Métabolisme du cadmium chez les bactéries .....	- 27 -
<b>I-4. Transfert facilité de métaux par les bactéries .....</b>	<b>- 29 -</b>
I-4-1. Interactions de surface et théorie DLVO.....	- 29 -
I-4-2. Transfert et rétention des colloïdes en milieu poreux.....	- 30 -
I-4-2-1. Mobilisation des colloïdes .....	- 30 -
I-4-2-2. Dépôts des colloïdes .....	- 31 -
I-4-3. Effet des facteurs physico-chimiques sur le transport de colloïdes .....	- 32 -
I-4-3-1. Force ionique et valence des ions .....	- 32 -
I-4-3-2. Effet du pH de la solution du sol .....	- 32 -
I-4-3-3. Effet de la taille et de la concentration en colloïdes.....	- 33 -
I-4-3-4. Effet de la vitesse d'écoulement dans le milieu poreux.....	- 34 -
I-4-3-5. Effet de la géométrie du milieu.....	- 34 -
I-4-4. Particularité du transport des biocolloïdes .....	- 35 -
<b>I-5. Etude du transfert de polluants associés aux colloïdes .....</b>	<b>- 36 -</b>
I-5-1. Mise en évidence du transport de polluants facilité par les colloïdes.....	- 36 -
I-5-2. Conditions d'activation du transport de polluants associés aux colloïdes bactériens.....	- 38 -
<b>I-6. Objectifs de la thèse et démarches expérimentales .....</b>	<b>- 39 -</b>

## **CHAPITRE II Etude de la distribution subcellulaire des métaux chez les bactéries :**

### **Présentation et Méthodologie ..... - 41 -**

#### **II-1. Introduction..... - 43 -**

#### **II-2. Matériel et méthodes..... - 45 -**

II-2-1.	Les métaux modèles .....	- 45 -
II-2-1-1.	Le zinc .....	- 45 -
II-2-1-2.	Effets du zinc sur la santé .....	- 45 -
II-2-1-3.	Impact du zinc sur l'environnement .....	- 46 -
II-2-1-4.	Le cadmium: généralités.....	- 46 -
II-2-1-5.	Effets du cadmium sur la santé .....	- 46 -
II-2-1-6.	Impact du cadmium sur l'environnement .....	- 46 -
II-2-1-7.	Analyses chimiques .....	- 47 -
II-2-2.	Les bactéries modèles .....	- 48 -
II-2-2-1.	Choix des souches.....	- 48 -
II-2-2-2.	Milieux de cultures .....	- 49 -
II-2-2-3.	Caractéristiques morphologiques des bactéries étudiées .....	- 50 -
II-2-2-4.	Caractérisation de la réactivité membranaire des deux bactéries modèles .....	- 51 -
II-2-2-5.	Réactivité des cellules bactériennes au zinc et au cadmium .....	- 52 -
II-2-3.	Conditions d'exposition des bactéries aux métaux.....	- 53 -
II-2-4.	Technique de caractérisation des nanogranules extracellulaires.....	- 53 -
II-2-5.	Technique de fractionnement chimique à l'EDTA.....	- 53 -
II-2-6.	Technique de fractionnement physique des cellules.....	- 54 -
II-2-7.	Techniques de microscopie électronique.....	- 56 -
II-2-7-1.	Microscopie Electronique à Transmission (MET) et à Balayage (MEB) .....	- 56 -
II-2-7-2.	Cryo-Microscopie Electronique à Transmission (CryoMET).....	- 57 -

#### **II-3. Résultats..... - 57 -**

II-3-1.	Observation directe de la distribution subcellulaire des métaux.....	- 57 -
II-3-1-1.	Visualisation en microscopie électronique .....	- 57 -
II-3-1-2.	Etude des nanobiogranules riche en Cd.....	- 60 -
II-3-2.	.....	- 61 -
II-3-3.	Caractérisation de la distribution subcellulaire des métaux par fractionnement chimique à l'EDTA .....	- 61 -
II-3-3-1.	Distribution subcellulaire du zinc et du cadmium dans les deux bactéries modèles après fractionnement chimique .....	- 61 -
II-3-4.	Caractérisation de la distribution subcellulaire des métaux par fractionnement physique des cellules bactériennes .....	- 65 -
II-3-4-1.	Validation du protocole expérimental en MET.....	- 65 -
II-3-4-2.	Distribution subcellulaire du cadmium et du zinc chez <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34.....	- 66 -
II-3-4-3.	Comparaison aux isothermes de sorption .....	- 67 -

#### **II-4. Discussion ..... - 68 -**

II-4-1.	Etude qualitative de la distribution du zinc et du cadmium dans les bactéries modèles.....	- 68 -
II-4-2.	Etude quantitative de la distribution du zinc et du cadmium dans les bactéries modèles.....	- 69 -

#### **II-5. Conclusion ..... - 71 -**

## **CHAPITRE III Effet de l'état métabolique des cellules bactériennes sur l'accumulation et la distribution subcellulaire de métaux seuls ou en mélange..... - 73 -**

#### **III-1. Introduction ..... - 75 -**

#### **III-2. Matériel et méthodes ..... - 76 -**

III-2-1.	Les modèles bactériens.....	- 76 -
III-2-2.	Mode d'exposition des bactéries aux métaux .....	- 77 -
III-2-3.	Etude de la toxicité du zinc et du cadmium sur les deux bactéries modèles.....	- 77 -

III-2-4.	Etude de la distribution subcellulaire des métaux par fractionnement physique (Presse de French) .....	- 79 -
III-2-5.	Dosages biochimiques des sucres et des protéines .....	- 79 -
<b>III-3.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>- 80 -</b>
III-3-1.	Effet des métaux sur la croissance bactérienne .....	- 80 -
III-3-1-1.	Calibration des différentes méthodes analytiques .....	- 80 -
III-3-1-2.	Suivi de croissance des cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 .....	- 80 -
III-3-1-3.	Suivi de croissance des cellules de <i>Escherichia coli</i> K12Dh5a .....	- 82 -
III-3-1-4.	Effet des métaux sur la viabilité cellulaire .....	- 83 -
III-3-2.	Etude de la biosorption du zinc et du cadmium et de leur distribution subcellulaire dans les cellules bactériennes inactives (4°C).....	- 85 -
III-3-2-1.	Données brutes.....	- 85 -
III-3-2-2.	Distribution subcellulaire du zinc et du cadmium dans les cellules inactives (4°C) de <i>Escherichia coli</i> K12Dh5a et de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34.....	- 88 -
III-3-2-3.	Comparaison aux isothermes de sorption .....	- 89 -
III-3-2-4.	Distribution subcellulaire du zinc et du cadmium en mélange dans des cellules inactives (4°C) de <i>Escherichia coli</i> K12Dh5a et <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34.....	- 90 -
III-3-3.	Distribution subcellulaire du zinc et du cadmium biosorbées par des cellules actives (30°C) de <i>Escherichia coli</i> K12Dh5a et <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 .....	- 93 -
III-3-3-1.	Cas du zinc et du cadmium seuls .....	- 93 -
III-3-3-2.	Cas du zinc et du cadmium en mélange .....	- 94 -
III-3-3-3.	Dosages biochimiques des protéines et sucres en fin de croissance cellulaire.....	- 95 -
<b>III-4.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>- 97 -</b>
III-4-1.	Biosorption et distribution subcellulaire du zinc et du cadmium dans des cellules inactives (4°C) de <i>Escherichia coli</i> K12Dh5a et de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34.....	- 97 -
III-4-2.	Biosorption et distribution subcellulaire du zinc et du cadmium dans des cellules actives (30°C) de <i>Escherichia coli</i> K12Dh5a et de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34.....	- 98 -
III-4-3.	Biosorption et distribution subcellulaire du zinc et du cadmium en mélange dans les cellules de <i>Escherichia coli</i> K12Dh5a et <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 .....	- 100 -
<b>III-5.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>- 102 -</b>
<b>CHAPITRE IV</b>	<b><i>Etude du transfert de bactéries en colonne de laboratoire</i> .....</b>	<b>- 105 -</b>
<b>IV-1.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>- 107 -</b>
<b>IV-2.</b>	<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>- 109 -</b>
IV-2-1.	Les bactéries modèles .....	- 109 -
IV-2-2.	Le milieu poreux modèle : le sable d'Hostun HN34 .....	- 109 -
IV-2-2-1.	Propriétés chimiques du sable d'Hostun .....	- 109 -
IV-2-3.	Méthodes analytiques pour la quantification des bactéries dans les effluents de colonne..	- 110 -
IV-2-3-1.	Mesure de la densité optique à 600nm.....	- 110 -
IV-2-3-2.	Quantification par cytométrie en flux .....	- 110 -
IV-2-4.	Etude en colonnes de laboratoire.....	- 111 -
IV-2-4-1.	Principe des études de transfert en colonnes de laboratoire .....	- 111 -
IV-2-4-2.	Mise en place du dispositif expérimental.....	- 111 -
IV-2-4-3.	Profils de rétention des cellules bactériennes dans la colonne .....	- 113 -
IV-2-4-4.	Etude des caractéristiques du transport de bactéries par modélisation inverse .....	- 113 -
IV-2-5.	Théorie de l'étude du transport de solutés en colonnes de laboratoire .....	- 114 -
IV-2-5-1.	Analyse des courbes de percée : méthode des moments .....	- 116 -
<b>IV-3.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>- 117 -</b>
IV-3-1.	Caractérisation du sable d'Hostun .....	- 117 -
IV-3-1-1.	Taille et forme des grains.....	- 117 -
IV-3-1-2.	Charge de surface du sable d'Hostun.....	- 117 -
IV-3-2.	Caractérisation des propriétés bio-physicochimiques des bactéries modèles .....	- 118 -
IV-3-2-1.	Morphologie des cellules bactériennes .....	- 118 -
IV-3-2-2.	Analyse granulométrique des deux bactéries modèles.....	- 118 -
IV-3-2-3.	Hydrophobie et potentiel zêta = f(pH) .....	- 119 -

IV-3-2-4.	Calcul des profils énergétiques d'interaction entre le sable d'Hostun et les bactéries modèles .....	- 120 -
IV-3-3.	Application de la cytométrie en flux au dénombrement des cellules bactériennes.....	- 120 -
IV-3-3-1.	Quantification des cellules bactériennes en conditions de mélange.....	- 122 -
IV-3-4.	Etude du transport des 2 bactéries modèles en colonne de sable d'Hostun : mise au point méthodologique .....	- 124 -
IV-3-4-1.	Reproductibilité des essais de transfert des bactéries.....	- 124 -
IV-3-4-2.	Application de la cytométrie en flux pour la quantification des bactéries dans les effluents de colonnes de sable .....	- 125 -
IV-3-4-3.	Effet du type de souche bactérienne sur le transfert des cellules bactériennes en colonnes de sable d'Hostun .....	- 127 -
IV-3-5.	Effet de la concentration cellulaire sur le transport des bactéries en colonne de sable d'Hostun. ....	- 130 -
IV-3-5-1.	<i>Escherichia coli</i> K12DH5a.....	- 130 -
IV-3-5-2.	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 .....	- 131 -
IV-3-6.	Effet du milieu poreux sur le transport des bactéries modèles .....	- 133 -
IV-3-7.	Etude du transport de bactéries en mélange en colonne de sable d'Hostun.....	- 136 -
<b>IV-4.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>- 137 -</b>
IV-4-1.	Application de la cytométrie en flux .....	- 137 -
IV-4-2.	Effet du type de souche bactérienne sur le transport .....	- 137 -
IV-4-3.	Effet de la concentration cellulaire sur le transport .....	- 139 -
IV-4-4.	Effet du milieu poreux sur le transport de bactéries .....	- 141 -
IV-4-5.	Transport de bactéries en mélange en colonnes de sable d'Hostun.....	- 141 -
<b>IV-5.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>- 142 -</b>
<b>CHAPITRE V</b>	<b><i>Etude et modélisation du transport facilité des métaux par les bactéries en colonne de sable</i> .....</b>	<b>- 145 -</b>
<b>V-1.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>- 147 -</b>
<b>V-2.</b>	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>- 148 -</b>
V-2-1.	Le dispositif expérimental de transfert .....	- 148 -
V-2-2.	Méthodologie d'étude du transport du Zn et du Cd en colonnes de sable d'Hostun .....	- 149 -
V-2-3.	Méthodologie d'étude du transport facilité du Zn et du Cd par les bactéries en colonne de sable d'Hostun .....	- 149 -
V-2-4.	Profils verticaux de concentration des métaux retenus dans les colonnes de sable d'Hostun. ....	- 149 -
<b>V-3.</b>	<b>Modélisation du transfert des métaux en colonnes de sable d'Hostun.....</b>	<b>- 150 -</b>
V-3-1.	Modélisation couplée transport hydrodynamique / géochimie des métaux .....	- 150 -
V-3-2.	Paramétrisation du modèle couplé hydrodynamique/géochimie .....	- 151 -
V-3-2-1.	Modélisation du transport des métaux en colonne de sable d'Hostun .....	- 151 -
V-3-2-2.	Modélisation du transport des bactéries en colonne de sable d'Hostun.....	- 152 -
<b>V-4.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>- 153 -</b>
V-4-1.	Etude et modélisation du transport du cadmium et du zinc en colonne de sable d'Hostun .....	- 153 -
V-4-1-1.	Cas des métaux seuls .....	- 153 -
V-4-1-2.	Cas des métaux en mélange .....	- 155 -
V-4-1-3.	Modélisation du transport du Cd et du Zn seuls ou en mélange en colonnes de sable d'Hostun .....	- 157 -
<b>V-5.</b>	<b>Effet de la présence de bactéries sur le transport du cadmium et du zinc en colonne de sable d'Hostun.....</b>	<b>- 161 -</b>
V-5-1.	Effet de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34.....	- 161 -
V-5-1-1.	Cas des pollutions mono-métalliques de Zn et de Cd .....	- 161 -
V-5-1-2.	Cas du cadmium et du zinc en mélange.....	- 163 -
V-5-2.	Etude du transport du cadmium et du zinc par <i>Escherichia coli</i> K12DH5a.....	- 165 -
V-5-2-1.	Cas des pollutions mono-métalliques de Zn et de Cd .....	- 165 -
V-5-2-2.	Cas du Cd et du Zn en mélange .....	- 168 -

<b>V-6.</b>	<b>Modélisation du transport facilité des métaux par les bactéries .....</b>	<b>- 171 -</b>
V-6-1.	Modélisation du transport des bactéries en colonne de sable d'Hostun .....	- 171 -
V-6-2.	Modélisation des courbes de percée des métaux et bactéries .....	- 173 -
V-6-2-1.	Cas des pollutions mono-métalliques .....	- 173 -
V-6-2-2.	Cas du Cd et du Zn en mélange .....	- 177 -
V-6-3.	Modélisation des profils verticaux de rétention des métaux.....	- 181 -
<b>V-7.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>- 183 -</b>
V-7-1.	Transfert du zinc et du cadmium en colonne de sable d'Hostun .....	- 183 -
V-7-2.	Etude et modélisation de l'effet des bactéries sur le transport du cadmium et du zinc, seuls ou en mélange, en colonne de sable d'Hostun.....	- 184 -
<b>V-8.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>- 185 -</b>
<b>CHAPITRE VI</b>	<b><i>Conclusions et perspectives.....</i></b>	<b>- 187 -</b>
<b>VI-1.</b>	<b>Principaux résultats : .....</b>	<b>- 189 -</b>
<b>VI-2.</b>	<b>Perspectives .....</b>	<b>- 193 -</b>
<b>CHAPITRE VII</b>	<b><i>Références bibliographiques.....</i></b>	<b>- 195 -</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>.....</b>	<b>- 209 -</b>

## LISTE des FIGURES

Figure I-1 Taille et diversité des particules colloïdales, d'après (Kretzschmar et al., 1999).....	- 10 -
Figure I-2 : Schéma d'une cellule bactérienne. ....	- 11 -
Figure I-3: Schématisation des deux types de parois cellulaires bactériennes à Gram positif et négatif.....	- 12 -
Figure I-4: Schématisation des interactions entre métaux et bactéries (adaptée de Ledin, 2000). S correspond aux groupements réactifs présents sur la paroi bactérienne. $Me^{2+}$ correspond à un cation métallique. Org correspond à un composé organique.....	- 17 -
Figure I-5: schématisation des différents groupements fonctionnels de la membrane d' <i>E. coli</i> (d'après Guiné et al. 2006). ....	- 19 -
Figure I-6: Schématisation des structures moléculaires des ligands des surfaces bactériennes impliqués dans la biosorption du zinc et du cadmium en fonction de la concentration en métal (Guiné, 2006). ....	- 20 -
Figure I-7 : Schématisation des principaux processus physicochimiques impliqués dans l'assimilation d'éléments traces métalliques (ETM) par les microorganismes (d'après Worms et al., 2006).L correspond à un ligand capable de fixer le métal M, $L_L$ correspond à un ligand lipophile, $L_h$ correspond à un ligand hydrophile, $L_{bio}$ correspond à un ligand biologique et $M_{int}$ correspond au métal internalisé.....	- 23 -
Figure I-8: Principaux constituants des substances polymériques exogènes (EPS) bactériennes et leurs sites de fixation potentiels des métaux. ....	- 25 -
Figure I-9: Schéma représentant les principales familles de protéines impliquées dans le métabolisme du zinc chez les bactéries (Nies, 1999).....	- 27 -
Figure I-10:Schématisation des principales familles de protéines impliquées dans le métabolisme du cadmium chez les bactéries (Nies, 1999).....	- 28 -
Figure I-11: Profils de potentiel énergétique total d'interaction grain/colloïde d'après la théorie DLVO (Vitorge, 2010).....	- 29 -
Figure I-12: Mécanismes de dépôts de colloïdes sur un collecteur (d'après Rijnaarts, 1995 et Vitorge 2010). ....	- 31 -
Figure I-13:Interactions colloïdes – matrice, colloïdes - colloïdes et illustration des phénomènes de « blocking effect » et de « ripening effect » (d'après Camesano, 1999)....	- 34 -
Figure II-1: Photographie de l'ICP-OES Varian 720ES-OES (A) et de l'ICP-MS, Agilent 7500ce (B) utilisés pour les quantifications du Zn et du Cd. ....	- 48 -
Figure II-2: Cellules d' <i>Escherichia coli</i> K12Dh5 $\alpha$ observées en microscopie électronique à transmission (Guiné, 2006). ....	- 49 -
Figure II-3: Cellule de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 observée en microscopie électronique à transmission (Guiné, 2006).....	- 49 -
Figure II-4: Protocole de fractionnement chimique, à l'EDTA, des métaux biosorbés sur les bactéries.....	- 54 -
Figure II-5 : Presse de French et sa cellule de pression (Bioritech).....	- 55 -
Figure II-6: Schéma du protocole de fractionnement physique des bactéries (Presse de French). ....	- 56 -
Figure II-7: Observations au MET de cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5 $\alpha$ mise en contact ou non avec du zinc (1000ppm) et analyse EDX au niveau des granules intracellulaire (Guiné 2006, Desauay et al., 2009). ....	- 58 -
Figure II-8: Observations au Cryo-MET de cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34. ....	- 59 -

Figure II-9: Observations au Cryo-MET de cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 mise en contact avec du cadmium ( $10^{-4}$ M) selon des conditions d'exposition : A/ passive (4°C) ou B/ active (30°C) et analyse EDX au niveau des granules extracellulaire. ....	60 -
Figure II-10: Cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 sur un filtre de 0.22µm (Sartorius) observées en MEB-FEG (voltage de 5 KV) après culture en présence de cadmium à $10^{-4}$ M. ....	60 -
Figure II-11: Evolution des quantités mesurées de Zn et de Cd associées aux membranes et au cytoplasme de cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 exposées à $10^{-5}$ M et $10^{-4}$ M de Zn ou de Cd en fonction du temps de contact initial avec l'EDTA. Les barres d'erreur sont calculées avec des triplicats.....	64 -
Figure II-12 : Isothermes de sorption de Zn et Cd sur les cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34.....	65 -
Figure II-13: Observation du compartiment membranaire de cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 non exposées (A) et exposées (B) à $10^{-4}$ M de Cd, obtenues par casse cellulaire à la presse de French et ultracentrifugation à 20'000g. Les cellules sont observées en coloration négative en MET. ....	65 -
Figure II-14: Distribution du cadmium (A) et du zinc (B) dans les cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 après 2 heures de contact à 4°C mesurés après fractionnement physique des cellules. ....	67 -
Figure II-15: Isothermes de sorption de Zn et Cd sur les cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34. ....	68 -
Figure III-1: Schématisation du protocole de dénombrement des bactéries par la méthode de dilution et de culture sur boîtes de Pétri. ....	78 -
Figure III-2: Exemple de cytogramme FL3-H versus FL1-H de cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 colorées avec le kit Live/Dead® BacLight™ permettant de visualiser et de quantifier les cellules viables marquées au Syto9 et les cellules endommagées marquées à l'Iodure de Propidium (IP).....	79 -
Figure III-3 : Dénombrements cellulaires (cellules par mL) d'échantillons de concentration cellulaire croissante obtenus par mesure de la turbidité ( $DO_{600}$ ), culture sur boîte ou cytométrie en flux.....	80 -
Figure III-4: Courbes de croissance de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34, suivie par mesure de $DO_{600nm}$ en présence ou absence de zinc et/ou de cadmium à 0, $10^{-5}$ et $10^{-4}$ M. Les résultats correspondent à la moyenne de triplicats. ....	81 -
Figure III-5: Courbes de croissance de <i>Escherichia coli</i> K12DH5α, suivie par mesure de $DO_{600nm}$ en présence ou absence de zinc et/ou de cadmium à 0, $10^{-5}$ et $10^{-4}$ M. Les résultats correspondent à la moyenne de triplicats ....	82 -
Figure III-6: Observation en Cryo-MET de membranes endommagées de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 après contact avec 100 ppm de Cd en conditions actives d'exposition (30°C). ....	85 -
Figure III-7: Distribution du Cd et du Zn dans les trois compartiments subcellulaire des cellules de <i>Escherichia coli</i> K12Dh5α et de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 en conditions passives d'exposition (2 heures à 4°C). Les résultats sont représentés en µg de Cd et de Zn dans les 3 compartiments subcellulaire. ....	88 -
Figure III-8: Isothermes de sorption du Zn et du Cd sur les cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 et de <i>Escherichia coli</i> K12DHα (Guiné, 2006 ; Guiné et al., 2006, 2007). ....	89 -
Figure III-9: Distribution du Zn et du Cd, seuls ou en mélange, dans les trois compartiments subcellulaires des cellules de <i>Escherichia coli</i> K12Dh5α et de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 en conditions passives d'exposition (2 heures à 4°C). ....	92 -



Figure III-10: Distribution du Cd et du Zn dans les trois compartiments subcellulaire des cellules de <i>Escherichia coli</i> K12Dh5α et de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 en conditions actives d'exposition (48 heures à 30°C). Les résultats sont représentés en µg de Cd et de Zn dans les 3 compartiments subcellulaire. ....	93 -
Figure III-11: Distribution du Zn et du Cd, seuls ou en mélange, dans les trois compartiments subcellulaires des cellules de <i>Escherichia coli</i> K12Dh5α et de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 en conditions actives d'exposition (48 heures à 30°C). ....	94 -
Figure III-12 : Quantification des protéines et des sucres totaux dans le milieu de culture et dans les cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 après 48 heures de croissance en milieu TSM en absence et en présence de métaux. Les résultats sont normalisés par rapport au témoin (100%), les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types calculés avec des triplicats. ....	95 -
Figure III-13: Quantification des protéines et des sucres totaux dans le milieu de culture et dans les cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5α après 48 heures de croissance en milieu M9 en absence et en présence de métaux. Les résultats sont normalisés par rapport au témoin, les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types calculés avec des triplicats. ....	96 -
Figure IV-1 : Spectres d'excitation (bleu) et d'émission (rouge) du SYTO9 et du SYTOred 62 (données invitrogen). Les barres représentent les longueurs d'ondes caractéristiques du cytomètre en flux C6 d' Accuri. ....	110 -
Figure IV-2: Schéma et photographie du dispositif expérimental de transfert de bactéries et de métaux en colonne de laboratoire. ....	112 -
Figure IV-3: Granulométrie cumulée du sable d'Hostun HN34 après lavage à l'acide nitrique.. ....	117 -
Figure IV-4: Evolution du potentiel zêta des particules fines du sable d'Hostun avec le pH mesuré avec un zetamètre (NanoZS, Malvern Instruments). ....	118 -
Figure IV-5 : Distribution de taille des cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 et de <i>Escherichia coli</i> K12DH5α dans de l'eau distillée en granulométrie laser (Mastersizer 2000, Malvern). ....	119 -
Figure IV-6: Potentiel zêta de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 (en bleu) et <i>Escherichia coli</i> K12DH5α (en vert) à pH 6 et à différentes forces ioniques (d'après Guiné, 2006). ....	119 -
Figure IV-7 : Profils d'énergie d'interaction entre les deux bactéries modèles et le sable d'Hostun calculés par le modèle DLVO avec de l'eau distillée (Constante de Hamacker $6.5 \cdot 10^{-21}$ J). ....	120 -
Figure IV-8: Comparaison des courbes de percée de <i>C. metallidurans</i> CH34 obtenues en spectrophotométrie (DO <sub>600</sub> ) et cytométrie de flux à différentes concentrations cellulaires. ....	121 -
Figure IV-9: Exemple d'histogramme de fluorescence (FL1-H) et de cytogramme (SSC-H versus FSC-h) obtenu sur le cytomètre C6 d'Accuri pour la quantification de <i>Escherichia coli</i> K12Dh5α YFP après optimisation analytiques. ....	122 -
Figure IV-10: Exemples de cytogrammes et d'histogrammes de fluorescence obtenus lors de la quantification du mélange de cellules de <i>Escherichia coli</i> K12Dh5α YFP et <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34. En A, cytogramme et histogrammes bruts obtenus sans seuil analytique. En B, cytogramme et histogrammes bruts obtenus avec un seuil placé sur le laser bleu (FL1). En C, cytogramme et histogrammes bruts obtenus avec un seuil placé sur le laser rouge (FL4). ....	123 -
Figure IV-11: Courbes d'élution tripliquées des cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5α (A) et de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 (B) en colonne de sable d'Hostun. ....	124 -
Figure IV-12 : Courbes d'élution de <i>Escherichia coli</i> K12DH5α en colonne de sable d'Hostun à une concentration cellulaire de $10^9$ UFC.mL <sup>-1</sup> mesurées en spectrophotométrie et en cytométrie de flux. (Les écart-types sont calculés à partir des triplicats). ....	125 -

Figure IV-13 : Courbes d'élution de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 en colonne de sable d'Hostun à une concentration cellulaire de $4.10^8$ UFC.mL <sup>-1</sup> mesurées en spectrophotométrie et en cytométrie en flux. (Les écart-types sont calculés à partir des triplicats). .....	126 -
Figure IV-14 : Exemple d'histogrammes de fluorescence (FL1-A et FL4-A) et de cytogramme (SSC-A versus FSC-A) obtenus en cytométrie de flux pour la quantification de cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 colorées au Sytored62 avant les essais de transfert en colonne. ....	127 -
Figure IV-15 : Exemple d'histogramme de fluorescence (FL1-A) et de cytogramme (SSC-A versus FSC-A) obtenu en cytométrie de flux pour la quantification de faibles concentrations de cellules <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 colorées au Syto9 après les essais de transfert en colonne. ....	127 -
Figure IV-16: Courbes d'élution de <i>Escherichia coli</i> K12Dh5α ( $10^9$ UFC/mL) et <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 ( $4 \cdot 10^8$ UFC/mL) en colonnes de sable d'Hostun. Les symboles correspondent à la moyenne calculée sur les triplicats, les lignes correspondent aux données modélisées par Stanmod. Les écart types correspondent aux incertitudes sur les pesées pour l'axe des abscisses et à l'écart type moyen des expériences pour l'axe des ordonnées .....	128 -
Figure IV-17 : Profils de rétention des cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 et de <i>Escherichia coli</i> K12Dh5α dans la colonne en fin d'expérience de transfert en colonne de sable d'Hostun ( $V/V_0 = 4$ ). Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type calculé sur les duplicats. ....	129 -
Figure IV-18: Courbes d'élutions de <i>Escherichia coli</i> K12DH5α à différentes concentrations cellulaires initiales injectées: de $10^7$ à $4.5 \cdot 10^9$ UFC/mL. Les symboles correspondent aux données expérimentales et les pointillés aux données modélisées avec le logiciel Stanmod. ....	130 -
Figure IV-19: Courbes d'élutions de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 à différentes concentrations cellulaires initiales injectées: de $10^8$ à $9.10^8$ UFC/mL. Les symboles correspondent aux données expérimentales et les pointillés aux données modélisées avec le logiciel Stanmod.....	131 -
Figure IV-20 : Isotherme d'adsorption des cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 et de <i>Escherichia coli</i> K12Dh5α sur le sable d'Hostun. Données déduites des expériences de transfert : la concentration en cellules sorbées correspond à la différence entre la hauteur du créneau et celle du plateau et le nombre de cellules à l'équilibre correspond à la hauteur du plateau. ....	132 -
Figure IV-21 : Profils verticaux de rétention des cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 et d' <i>Escherichia coli</i> K12Dh5α, à faible et forte concentration d'injection, en fin d'expérience de transfert en colonne de sable d'Hostun ( $V/V_0 = 4$ ). Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type calculé sur des duplicats.....	133 -
Figure IV-22 : Effet du milieu poreux, sable de Fontainebleau ou sable d'Hostun, sur le transport des cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5α et de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 à différentes concentrations cellulaires d'injection. Les résultats concernant le transport dans le sable de Fontainebleau sont issus de Guiné (2006).....	134 -
Figure IV-23: Photographie du sable de Fontainebleau (gauche) et du sable d'Hostun (droite). ....	135 -
Figure IV-24 : Observation de la de taille et de la forme de grains de sable d'Hostun (A) et de Fontainebleau (B) en microscopie optique (Zeiss). ....	135 -
Figure IV-25: Distribution de taille des grains de sable de Fontainebleau, de sable d'Hostun et d'un standard de 50 µm (15-120 µm). Les valeurs correspondent à la moyenne de triplicats. ...	136 -
Figure IV-26: Courbes de percée des cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5α seules ou en présence de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 (A) et des cellules de <i>Cupriavidus</i>	

<i>metallidurans</i> CH34 seules ou en présence de <i>Escherichia coli</i> K12DH5α (B) en colonnes de sable d'Hostun. Les barres d'erreurs ont été calculées sur des triplicats. ....	137 -
Figure IV-27: Effet de la concentration cellulaire d'injection sur le taux de transfert (bilan de masse) de cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 et de <i>Escherichia coli</i> K12Dh5α mesurés en sortie de colonne de sable d'Hostun et de sable de Fontainebleau (Guiné, 2006). ...	139 -
Figure V-1: Photographies montrant l'extraction et la découpe de colonnes de sable d'Hostun humide après les expériences transport de métaux ou de bactéries. Chaque tranche est ensuite récupérée intégralement et conservée en flacon à 4°C avant analyse. ....	150 -
Figure V-2: Exemple d'évolution de la masse normalisée ( $M_{\text{éluee}} / M_{\text{tot}}$ ) du métal éluée en fonction de V/VO en condition de saturation des sites de rétention. ....	152 -
Figure V-3 : Profils de concentration solide du Zn (A) et du Cd (B) en colonnes de sable d'Hostun, après injection de solution de métaux à $10^{-5}$ , $10^{-4}$ et $5 \cdot 10^{-4}$ M. Les profils ont été mesurés après écoulement de 8 volumes de pores d'eau déminéralisée. ....	154 -
Figure V-4 : Courbes d'élution mesurées du Zn (A) et du Cd (B), injectés à $10^{-5}$ , $10^{-4}$ et $5 \cdot 10^{-4}$ M, en colonnes de sable d'Hostun. ....	155 -
Figure V-5 : Courbes d'élution du Zn (A) et du Cd (B) et profils de rétention du Zn (C) du Cd (D) en colonnes de sable d'Hostun, injectés en conditions de mélange à $10^{-4}$ (symbole gris) et $5 \cdot 10^{-4}$ M (symbole noir), mesurés après écoulement de 8 volumes de pores d'eau distillée. ....	157 -
Figure V-6: Evolution de la masse de cadmium et de zinc ( $5 \cdot 10^{-4}$ M) éluée des colonnes de sable d'Hostun en fonction de V/V0 normalisée par la masse injectée. ....	158 -
Figure V-7 : Courbes d'élution du Zn (A) et du Cd (C), injectés à $10^{-5}$ , $10^{-4}$ et $5 \cdot 10^{-4}$ M, et profils de concentration verticaux du Zn (B) et du Cd (D) en colonnes de sable d'Hostun, mesurés après écoulement de 8 volumes de pores d'eau distillée. Les symboles correspondent aux points expérimentaux, les lignes correspondent aux courbes calculées avec PhreeqC en utilisant les paramètres présentés dans le Tableau V-3. ....	158 -
Figure V-8: Evolution de la masse normalisée par la msse injectée de cadmium et du zinc en conditions de mélange ( $5 \cdot 10^{-4}$ M) éluée des colonnes de sable d'Hostun en fonction de V/V0... ..	159 -
Figure V-9 : Courbes d'élution du Zn (A) et du Cd (C), injectés en mélange à $10^{-4}$ et $5 \cdot 10^{-4}$ M, et profils de concentration verticaux du Zn (B) et du Cd (D) en colonnes de sable d'Hostun, mesurés après écoulement de 8 volumes de pores d'eau distillée. Les symboles correspondent aux points expérimentaux, les lignes correspondent aux courbes calculées avec PhreeqC en utilisant les paramètres présentés dans le Tableau V-3. ....	160 -
Figure V-10: Profils verticaux de concentration mesurés de Cd, injectés à $10^{-4}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M, dans les colonnes de sable d'Hostun avant (V/VO = 0) et après (V/VO = 4) injection des cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 et courbes d'élution du Cd en colonne de sable d'Hostun, injectés à $10^{-4}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M à V/VO = -7, en présence de cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 injectées à $5 \cdot 10^8$ UFC/mL à V/VO = 0. ....	162 -
Figure V-11 : Profils verticaux de concentration mesurés de Zn, injectés à $10^{-4}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M, dans les colonnes de sable d'Hostun avant (V/VO = 0) et après (V/VO = 4) injection des cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 et courbes d'élution du Zn en colonne de sable d'Hostun, injectés à $10^{-4}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M à V/VO = -7, en présence de cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 injectées à $5 \cdot 10^8$ UFC/mL à V/VO= 0. ....	163 -
Figure V-12: Profils verticaux de concentration mesurés de Cd, injectés en mélange à $10^{-4}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M, dans les colonnes de sable d'Hostun avant (V/VO = 0) et après (V/VO = 4) injection des cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 et courbes d'élution du Cd en colonne de sable d'Hostun, injectés en mélange à $10^{-4}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M à V/VO = -7, en présence de cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 injectées à $5 \cdot 10^8$ UFC/mL à V/VO = 0. -	164 -

Figure V-13 : Profils verticaux de concentration mesurés de Zn, injectés en mélange à $10^{-4}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M, dans les colonnes de sable d'Hostun avant ( $V/V_0 = 0$ ) et après ( $V/V_0 = 4$ ) injection des cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 et courbes d'élution du Zn en colonne de sable d'Hostun, injectés en mélange à $10^{-4}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M à $V/V_0 = -7$ , en présence de cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 injectées à $5 \cdot 10^8$ UFC/mL à $V/V_0 = 0$ .	- 165 -
Figure V-14 : Profils verticaux de concentration mesurés de Cd, injectés à $10^{-4}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M, dans les colonnes de sable d'Hostun avant ( $V/V_0 = 0$ ) et après ( $V/V_0 = 4$ ) injection des cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5 $\alpha$ et courbes d'élution du Cd en colonne de sable d'Hostun, injectés à $10^{-4}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M à $V/V_0 = -7$ , en présence de cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5 $\alpha$ injectées à $10^9$ UFC/mL à $V/V_0 = 0$ .	- 167 -
Figure V-15 : Profils verticaux de concentration mesurés de Zn, injectés à $10^{-4}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M, dans les colonnes de sable d'Hostun avant ( $V/V_0 = 0$ ) et après ( $V/V_0 = 4$ ) injection des cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5 $\alpha$ et courbes d'élution du Zn en colonne de sable d'Hostun, injectés à $10^{-4}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M à $V/V_0 = -7$ , en présence de cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5 $\alpha$ injectées à $10^9$ UFC/mL à $V/V_0 = 0$ .	- 167 -
Figure V-16: Profils verticaux de concentration mesurés de Cd, injectés en mélange à $10^{-4}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M, dans les colonnes de sable d'Hostun avant ( $V/V_0 = 0$ ) et après ( $V/V_0 = 4$ ) injection des cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5 $\alpha$ et courbes d'élution du Cd en colonne de sable d'Hostun, injectés en mélange à $10^{-4}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M à $V/V_0 = -7$ , en présence de cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5 $\alpha$ injectées à $10^9$ UFC/mL à $V/V_0 = 0$ .	- 170 -
Figure V-17 : Profils verticaux de concentration mesurés de Cd, injectés en mélange à $10^{-4}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M, dans les colonnes de sable d'Hostun avant ( $V/V_0 = 0$ ) et après ( $V/V_0 = 4$ ) injection des cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5 $\alpha$ et courbes d'élution du Cd en colonne de sable d'Hostun, injectés en mélange à $10^{-4}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M à $V/V_0 = -7$ , en présence de cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5 $\alpha$ injectées à $10^9$ UFC/mL à $V/V_0 = 0$ .	- 170 -
Figure V-18 : Evolution de la masse normalisée des cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 ( $5 \cdot 10^8$ UFC/mL) et de <i>Escherichia coli</i> K12DH5 $\alpha$ ( $10^9$ UFC/mL) éluée des colonnes de sable d'Hostun en fonction de $V/V_0$ .	- 171 -
Figure V-19 : Courbes de percées observées et calculées des cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 ( $5 \cdot 10^8$ UFC/mL) et de <i>Escherichia coli</i> K12DH5 $\alpha$ ( $10^9$ UFC/mL) en colonne de sable. Les lignes continues correspondent aux données modélisées avec un modèle hydrogéochimique sous PhreeqC en considérant la rétention des bactéries sur un (ligne grise) ou deux sites réactifs (ligne noire).	- 172 -
Figure V-20 : Courbes d'élution observées (symboles) et calculées (lignes) du Zn à $10^{-4}$ M (A) et à $5 \cdot 10^{-4}$ M (B) et du Cd à $10^{-4}$ M (C) et à $5 \cdot 10^{-4}$ M (D) (en noir) avant et après injection de cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 (en gris) injectées à $4 \cdot 10^8$ UFC/mL à $V/V_0 = 0$ .	- 175 -
Figure V-21 : Courbes d'élution observées (symboles) et calculées (lignes) du Zn à $10^{-4}$ M (A) et à $5 \cdot 10^{-4}$ M (B) et du Cd à $10^{-4}$ M (C) et à $5 \cdot 10^{-4}$ M (D) (en noir) avant et après injection de cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5 $\alpha$ (en gris) injectées à $10^9$ UFC/mL à $V/V_0 = 0$ .	- 176 -
Figure V-22 : Courbes d'élution mesurées et modélisées du Zn injecté à $10^{-4}$ M (A) et à $5 \cdot 10^{-4}$ M (B) et du Cd injecté à $10^{-4}$ M (C) et à $5 \cdot 10^{-4}$ M (D) à $V/V_0 = -7$ (en noir), en présence de cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 (en gris) injectées à $4 \cdot 10^8$ UFC/mL à $V/V_0 = 0$ . Les symboles correspondent aux données mesurées, les lignes continues correspondent aux données modélisées.	- 179 -
Figure V-23 : Courbes d'élution mesurées et modélisées du Zn à $10^{-4}$ M (A) et à $5 \cdot 10^{-4}$ M (B) et du Cd injecté à $10^{-4}$ M (C) et à $5 \cdot 10^{-4}$ M (D) à $V/V_0 = -7$ (en noir), en présence de cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5 $\alpha$ (en gris) injectées à $10^9$ UFC/mL à $V/V_0 = 0$ . Les symboles correspondent aux données mesurées, les lignes continues correspondent aux données modélisées.	- 180 -

Figure V-24 : Profils de concentration mesurés et modélisés du Zn et du Cd, injectés à  $10^{-4}$ M et à  $5 \cdot 10^{-4}$ M, dans les colonnes de sable d'Hostun avant injection des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 à  $V/VO = 0$  et après avant injection des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 à  $V/VO = 4$ . Les symboles correspondent aux données mesurées, les lignes continues correspondent aux données modélisées. ....- 181 -

Figure V-25 : Profils de concentration mesurés et modélisés du Zn et du Cd, injectés à  $10^{-4}$ M et à  $5 \cdot 10^{-4}$ M, dans les colonnes de sable d'Hostun avant injection des cellules de *Escherichia coli* K12DH5α à  $V/VO = 0$  et après avant injection des cellules de *Escherichia coli* K12DH5α à  $V/VO = 4$ . Les symboles correspondent aux données mesurées, les lignes continues correspondent aux données modélisées. ....- 182 -

Figure V-26 : Profils de concentration mesurés et modélisés du Zn et du Cd, injectés en mélange à  $10^{-4}$ M et à  $5 \cdot 10^{-4}$ M, dans les colonnes de sable d'Hostun avant injection des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 à  $V/VO = 0$  et après avant injection des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 à  $V/VO = 4$ . Les symboles correspondent aux données mesurées, les lignes continues correspondent aux données modélisées. ....- 182 -

Figure V-27 : Profils de concentration mesurés et modélisés du Zn et du Cd, injectés en mélange à  $10^{-4}$ M et à  $5 \cdot 10^{-4}$ M, dans les colonnes de sable d'Hostun avant injection des cellules de *Escherichia coli* K12DH5α à  $V/VO = 0$  et après avant injection des cellules de *Escherichia coli* K12DH5α à  $V/VO = 4$ . Les symboles correspondent aux données mesurées, les lignes continues correspondent aux données modélisées. ....- 183 -

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1: Teneur en huit éléments traces dans les sols agricoles français en $\text{mg.kg}^{-1}$ de sol sec (Baize et al., 2007). .....	15 -
Tableau I-2: Principaux groupements fonctionnels et constituants membranaires chez les bactéries (d'après Cox et al., 1999). .....	18 -
Tableau I-3: Capacité de biosorption des éléments traces métalliques (ETM) par les EPS bactériennes .....	26 -
Tableau II-1: Principales propriétés physico-chimiques du zinc et du cadmium (Bisson et al., 2005; Brignon and Malherbe, 2005). .....	45 -
Tableau II-2: Composition des différents milieux de culture des bactéries modèles.....	50 -
Tableau II-3: Caractéristiques morphologiques des cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 et <i>Escherichia coli</i> K12DH5 $\alpha$ (Guiné, 2006 et cette étude). .....	51 -
Tableau II-4 : Constantes de déprotonation et de complexation du cadmium et du zinc sur les cellules bactériennes de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 et d' <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ (Guiné, 2006). .....	52 -
Tableau II-5: Résultats des dosages de Cd (en $\mu\text{g}$ ) dans les filtres d'ultrafiltration après digestion et extraction à l'eau régale. ....	61 -
Tableau II-6: Distribution subcellulaire du zinc dans les cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34, mesurée après fractionnement chimique à l'EDTA. Les données sont en $\mu\text{g}$ de Zn par compartiment ( $\pm 1$ écart type calculé avec des triplicats). ....	63 -
Tableau II-7: Distribution subcellulaire du cadmium dans les cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 mesurée après fractionnement chimique à l'EDTA. Les données sont en $\mu\text{g}$ de Cd par compartiment ( $\pm 1$ écart type calculé avec les triplicats). .....	63 -
Tableau II-8: Distribution subcellulaire du cadmium et du zinc dans les cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 après fractionnement physique des cellules. Les données sont présentées en $\mu\text{g}$ de Cd et de Zn par compartiment ( $\pm 1$ écart type calculé avec des triplicats). .....	66 -
Tableau II-9 : Distribution subcellulaire du Cd dans des bactéries à Gram- pour 2 concentrations initiales différentes, mesurée par fractionnement chimique à l'EDTA ( $10^{-2}\text{M}$ et 1 minute de contact). ....	70 -
Tableau III-1: Taux de croissance $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ ) et temps de génération (en min.) de la bactérie <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 mesurés en milieu TSM en absence et en présence de Zn et Cd à $10^{-5}$ et $10^{-4}\text{M}$ . .....	81 -
Tableau III-2 : Taux de croissance $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ ) et temps de génération (en min.) de la bactérie <i>Escherichia coli</i> K12DH5 $\alpha$ mesurés en milieu M9 en absence et en présence de Zn et Cd à $10^{-5}$ et $10^{-4}\text{M}$ . .....	83 -
Tableau III-3: Effet des métaux sur la viabilité des cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 obtenus en cytométrie en flux avec l'utilisation du kit Live/Dead® BacLight™. ....	84 -
Tableau III-4: Distribution subcellulaire du cadmium dans les cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5 $\alpha$ et <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 en conditions d'exposition active ( $30^{\circ}\text{C}$ ) et passive ( $4^{\circ}\text{C}$ ) d'exposition aux métaux. Les données sont en $\mu\text{g}$ de Cd par compartiment ( $\pm$ écart type calculé d'après des triplicats). La masse initiale de Cd (en $\mu\text{g}$ ) et les pourcentages de récupération du Cd sont également indiqués. ....	86 -
Tableau III-5: Distribution subcellulaire du zinc dans les cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5 $\alpha$ et <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 en conditions d'exposition active ( $30^{\circ}\text{C}$ ) et passive ( $4^{\circ}\text{C}$ ) d'exposition aux métaux. Les données sont en $\mu\text{g}$ de Zn par compartiment ( $\pm$ écart type calculé d'après des triplicats). La masse initiale de Zn (en $\mu\text{g}$ ) et les pourcentages de récupération du Zn sont également indiqués. ....	87 -

Tableau III-6 : Distribution subcellulaire du cadmium et du zinc sur les cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5α et <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 en conditions actives et passives d'exposition à Cd et Zn en mélange. Les données sont en µg de métal par compartiment (± 1 écart type calculé d'après les triplicats). La masse initiale de contamination (en µg) et les pourcentages de récupération sont également indiqués. ....	91 -
Tableau III-7: Comparaison des quantités totales de Zn et de Cd membranaires intracellulaire et de la quantité de métal total bioaccumulé (en µg) biosorbées par les cellules inactives de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34. ....	92 -
Tableau III-8 : Comparaison des quantités de Zn et de Cd dans les compartiments membranaires, intracellulaire et la quantité de métal total bioaccumulé (en µg) entre les conditions mono exposition et conditions de mélange chez <i>Escherichia coli</i> K12Dh5α. ...	93 -
Tableau III-9: Masses de protéines et de sucres totaux (en µg) dans le milieu de culture et associés aux cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 après 48 heures de croissance en milieu TSM en absence et en présence de métaux. ....	96 -
Tableau III-10 : Masse de protéines et de sucres totaux (en µg) dans le milieu de culture et associés aux cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5α après 48 heures de croissance en milieu M9 en absence et en présence de métaux. ....	97 -
Tableau IV-1: Composition chimique du sable d'Hostun HN34. ....	109 -
Tableau IV-2: Résultats expérimentaux et de simulation des expériences de transport de <i>E. coli</i> K12DH5α à différentes concentrations cellulaires analysée en cytométrie de flux (C6 Accuri). ....	129 -
Tableau IV-3: Effet de la concentration cellulaire d'injection sur les paramètres de transfert de <i>Escherichia coli</i> K12DH5α en colonne de sable d'Hostun. ....	131 -
Tableau IV-4: Effet de la concentration cellulaire d'injection sur les paramètres de transfert de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 en colonne de sable d'Hostun. ....	132 -
Tableau V-1: Conditions expérimentales et paramètres des essais de transfert du zinc ou du cadmium et des profils de concentrations du zinc ou du cadmium dans les colonnes de sable d'Hostun. ....	154 -
Tableau V-2 : Conditions expérimentales et paramètres des essais de transfert du zinc et du cadmium en mélange et des profils de concentrations du zinc ou du cadmium en mélange dans les colonnes de sable d'Hostun. ....	156 -
Tableau V-3 : Paramètres de modélisation calés avec l'ajustement des courbes de percée du zinc ou du cadmium, seul ou en mélange, et des profils de rétention du zinc ou du cadmium dans les colonnes de sable d'Hostun. ....	160 -
Tableau V-4 : Conditions expérimentales des essais de transfert du Zn ou du Cd réalisés en présence de cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 ( $4 \cdot 10^8$ UFC/mL) et des profils de concentrations des métaux dans les colonnes de sable d'Hostun. ....	161 -
Tableau V-5: Conditions expérimentales des essais de transfert du Zn et du Cd en mélange réalisés en présence de cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 ( $5 \cdot 10^8$ UFC/mL) et des profils de concentrations des métaux dans les colonnes de sable d'Hostun. ....	164 -
Tableau V-6: Conditions expérimentales des essais de transfert du Zn ou du Cd réalisés en présence de cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5α ( $5 \cdot 10^8$ UFC/mL) et des profils de concentrations des métaux dans les colonnes de sable d'Hostun. ....	166 -
Tableau V-7: Conditions expérimentales des essais de transfert du Zn et du Cd en mélange réalisés en présence de cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5α ( $5 \cdot 10^8$ UFC/mL) et des profils de concentrations des métaux dans les colonnes de sable d'Hostun. ....	168 -
Tableau V-8: Constantes de déprotonation et de complexation des métaux sur les cellules bactériennes de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 et de <i>Escherichia coli</i> K12DH5α (d'après Guiné, 2006). ....	172 -

Tableau V-9 : Paramètres de modélisation calés par l'ajustement des courbes de percée et des profils de rétention du zinc ou du cadmium, en présence de cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 dans les colonnes de sable d'Hostun. ....	- 173 -
Tableau V-10 : Paramètres de modélisation calés par l'ajustement des courbes de percée et des profils de rétention du zinc ou du cadmium, en présence de cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5α dans les colonnes de sable d'Hostun. ....	- 173 -
Tableau V-11 : Paramètres de modélisation calés par l'ajustement des courbes de percée e et des profils de rétention du zinc ou du cadmium en mélange, après injection de cellules de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 dans les colonnes de sable d'Hostun. ....	- 177 -
Tableau V-12 : Paramètres de modélisation calés par l'ajustement des courbes de percée e et des profils de rétention du zinc ou du cadmium en mélange, après injection de cellules de <i>Escherichia coli</i> K12DH5α dans les colonnes de sable d'Hostun. ....	- 177 -
Tableau VIII1 : Longueurs d'ondes caractéristiques des lasers du cytomètre C6 de Accuri.....	- 212 -



## **ABREVIATIONS UTILISEES**

BM	Bilan de masse
C0	Concentration initiale
Cd	Cadmium
CDF	Cation Diffusion Facilitors
CEMOVIS	Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections
CMI	Concentration Minimale d'Inhibition
DLVO	Théorie du nom de ses auteurs Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek
EDTA	acide EthylèneDiamineTétraAcétique
EDX	Énergie Dispersive X-ray spectrometry
EPS	Extracellular polymeric substances
ETM	Elements Traces Métalliques
EXAFS	Extended X-ray Absorption Fine Structure spectroscopy
FL-H	Fluorescence - Height
FSC-H	Forward SCatter - Height
GFP	Green Fluorescent Protein
HF-PLM	Hollow Fiber Permeation Liquid Membrane
ICP	Inductive Coupled Plasma
ICP-AES	Inductive Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry
ICP-MS	Inductive Coupled Plasma - Mass Spectrometry
ICP-OES	Inductive Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry
IP	Iodure de Propidium
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharides
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MES	tampon 2-(N-Morpholino)Ethane Sulfonic
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MO	Matière organique
PG	Peptidoglycane
PIE	Point IsoElectrique
RND	Resistance-Nodulation-cell Division

SSC-H	Side Scatter - Height
TSM	Tris Salt Medium
UFC	Unité Formant Colonie
Vp	Volume de pore
YFP	Yellox Fluorescent Protein
Zn	Zinc



## **Introduction**



L'importance de la disponibilité des métaux pour les microorganismes est bien connue, nombre d'entre eux sont essentiels et associés à des protéines nécessaires à leur croissance et au métabolisme cellulaire (Lovley and Lloyd, 2000). Un certain nombre de métaux, parmi les plus abondants, sont toxiques pour l'environnement et pour les microorganismes. Les sources anthropiques, principalement les mines et les activités industrielles, contribuent à l'accroissement des concentrations en métaux dans l'air et dans les écosystèmes terrestres et aquatiques (Gelabert et al., 2006). La dispersion des métaux dans l'atmosphère liée aux activités anthropiques (industrie métallurgique, incinération des déchets, pratiques agricoles, transport, combustion des énergies fossiles, etc.) est aujourd'hui d'une importance égale sinon supérieure à celle d'origine naturelle (éruptions volcaniques, érosion...). Une fois en circulation, les métaux se distribuent dans tous les compartiments de la biosphère : terre, air, océan. L'activité anthropique n'a ni créé, ni supprimé des métaux, elle a essentiellement modifié leur distribution, leur spéciation et leur concentration dans les différents compartiments de la biosphère. La compréhension des mécanismes impliqués dans le devenir des métaux au cours de leur transfert dans les sols revêt un triple intérêt : évaluer leur impact sanitaire et économique sur le long terme (perte de surfaces agricoles, dépollution des sols), prévoir les risques de pollution des nappes et eaux de surface (biodisponibilité et lessivage des métaux dans les sols) et concevoir des techniques de dépollution appropriées (Martin and Ruby, 2004; Guiné et al., 2006). La mobilité des métaux dans les sols dépend d'une part de leurs sites de rétention sur les solides (nature et densité, propres à chaque élément métallique) mais aussi des conditions physicochimiques locales telles que le pH ou la teneur en eau des sols (Février, 2001; Sigg et al., 2001). Depuis quelques années les particules colloïdales sont soupçonnées d'intervenir dans la dynamique des métaux dans les sols. Ces mécanismes permettraient d'expliquer la présence précoce et inattendue de contaminants à une certaine distance de leur source d'émission (Ledin, 2000). Il est communément accepté qu'une partie solide du sol puisse être mobile sous certaines conditions physico-chimiques. Il s'agit notamment de particules colloïdales tels que des argiles et de la matière organique (MO). Parmi les colloïdes organiques du sol, on distingue également les biocolloïdes tels que les microorganismes et les virus. Ces colloïdes, inorganiques et organiques, sont bien connus pour leur participation à l'augmentation de la part de contaminants en phase liquide. Pour mettre en évidence le rôle que peuvent jouer les colloïdes dans le transport des polluants, il faut donc considérer d'une part les interactions entre les métaux et les colloïdes et d'autre part les mécanismes de mobilisation et de transport des colloïdes vecteurs des métaux.

Les microorganismes, en particulier les bactéries, peuvent interagir avec les métaux de différentes manières. On peut tout d'abord observer une transformation des métaux par des processus d'oxydation/réduction ou d'alkylation. Ces modifications modifient généralement la toxicité et la mobilité du métal d'origine. Les métaux peuvent également être accumulés par des phénomènes d'adsorption passive (indépendante du métabolisme) au niveau des membranes ou par transport actif à l'intérieur de la cellule (dépendante du métabolisme). Il a également été observé l'implication de substances polymériques extracellulaires (EPS en anglais) produites par des microorganismes en milieu naturel ou artificiel. Les EPS sont composées d'une grande variété de macromolécules de haut poids moléculaire tels que des polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques et également des phospholipides et quelques molécules de faible poids moléculaire non-polymériques. Les EPS jouent un rôle important dans l'adhésion cellulaire, la formation d'agrégats cellulaires (biofilms, sludges, biogranules) et protègent les cellules des agressions du milieu (Bhaskar and Bhosle, 2006; Pal and Paul, 2008). Les EPS, de par leurs caractéristiques chimiques, sont potentiellement fixatrices de métaux. Enfin les bactéries peuvent, de manière indirecte, influencer la mobilité

des métaux par des modifications physicochimiques du milieu comme par exemple la modification du potentiel redox, du pH...(Guiné, 2006).

L'approche classique pour étudier les interactions bactéries/métaux est basée principalement sur la prise en compte de l'interface que constitue la paroi cellulaire. Ainsi, la paroi bactérienne est assimilée à l'association de groupements fonctionnels de surface susceptibles de réagir avec les éléments extérieurs. En effet, étant en contact avec le milieu extérieur, les différentes molécules ou éléments présents sur la couche externe des cellules sont des sites d'interaction privilégiés avec l'environnement (ions, métaux, pesticides, constituants du sol...). Ces groupements réactifs ou fonctionnels vont caractériser en partie la réactivité des bactéries. Des techniques très différentes ont été utilisées pour caractériser ces groupements fonctionnels réactifs des cellules bactériennes (titrations acide-base, EXAFS, spectroscopie infrarouge...). Fein et al. (1997) ont les premiers proposé un modèle de sorption des métaux par les cellules bactériennes qui implique des groupements fonctionnels acides (carboxyles et phosphodiesters ;  $pK < 4.7$ ), neutres (phosphomonoesters ;  $pK \approx 7$ ) et basiques (amines et/ou hydroxyles ;  $pK > 8$ ). Yee and Fein (2001) ont montré que de nombreuses bactéries à Gram négatif ou positif présentaient une capacité de sorption des métaux comparable, et qu'un modèle de complexation « universel » pouvait être envisagé pour décrire la fixation des métaux par les cellules bactériennes et ainsi contribuer à mieux prédire le devenir des métaux dans les sols.

Sur la base de cette conceptualisation, Guiné et al. (2006) ont calculé que la membrane de trois bactéries modèles à Gram négatif (*E. coli* K12DH5 $\alpha$ , *C. metallidurans* CH34 et *P. putida* ATCC12633) présentait une densité de sites théorique inférieure à 2 atomes de zinc par nm<sup>2</sup>. En pratique il s'est avéré que ces bactéries étaient capables de fixer de 16 à 56 atomes de zinc par nm<sup>2</sup>. Ces résultats montrent que la réactivité des bactéries ne peut s'expliquer par la seule rétention des métaux sur les membranes et que d'autres composants ou compartiments cellulaires doivent également intervenir. Les principales hypothèses pour expliquer ces résultats sont :

- la capacité des bactéries à internaliser les métaux par diffusion passive ou par leurs systèmes de transporteurs actifs.
- la capacité des bactéries à synthétiser des EPS qui vont potentiellement fixer et « inerte » les métaux dans le milieu extracellulaire ou sur les membranes (Guibaud et al., 2005; Comte et al., 2006a; Ha et al., 2010; Guiné et al., 2006).
- la capacité de certaines bactéries résistantes aux métaux, telle que *C. metallidurans* CH34, à expulser les métaux dans le milieu extracellulaire par un système d'efflux spécifique (Mergeay et al., 1987; Nies and Silver, 1995; Nies, 2003).

Ces interactions contrôlent la biodisponibilité et la mobilité des métaux dans les sols, les sédiments ou l'eau. Si un métal est piégé par des cellules bactériennes, son devenir leur est alors intimement lié. En dépit de leur faible proportion en masse dans les sols, les particules colloïdales peuvent participer à l'augmentation de la solubilité apparente des polluants. En effet, si ces contaminants s'adsorbent fortement sur des colloïdes mobiles, alors ces polluants peuvent être transportés rapidement et sur de longues distances. Ce mécanisme est connu sous le nom de transport facilité des polluants par les colloïdes. La plupart des observations de transport facilité des contaminants par les colloïdes sont basées sur des observations de terrain (indirectes), des calculs ou des expériences de laboratoire en colonnes. Plusieurs revues de littérature concernant les mécanismes de facilitation du transport des contaminants liés à la présence de particules colloïdales ont été publiées : McCarthy and Zachara (1989), Mills *et al.* (1991), Ryan and Elimelech (1996) et Kretzschmar *et al.* (1999) ou plus récemment Sen and Khilar (2006) (qui intègrent le rôle des colloïdes biotiques à leur étude). Ces expériences montrent que sous certaines conditions favorables à la libération de colloïdes vers la solution,

le transport colloïdal des métaux peut être un processus important de migration des métaux dans les sols, même dans les zones non contaminées des sols.

A ce jour, de nombreuses études ont porté sur le transport de colloïdes minéraux ou synthétiques (McCarthy and Zachara, 1989; Ryan and Elimelech, 1996; Kretzschmar et al., 1999; Sen and Khilar, 2006) qui, bien qu'intéressantes, ne sont pas toujours applicables aux mécanismes de transfert des colloïdes bactériens (Foppen and Schijven, 2006; Sen and Khilar, 2006). En effet, les colloïdes bactériens sont sujets aux mêmes processus physicochimiques que les colloïdes abiotiques mais aussi à un certain nombre de facteurs ou processus biologiques qui affectent leur transport, tels que les concentrations en cellules et en substrat, la croissance et l'inactivation cellulaires ou encore l'activité biologique (métabolisme) (Sen et al., 2004; Sen et al., 2005; Foppen and Schijven, 2006). Pour cette raison, les colloïdes bactériens présentent rarement un comportement classique et transposable à différents types de sols. Pour mettre en évidence le rôle que peuvent jouer les biocolloïdes dans le transport des polluants, il faut donc considérer d'une part le transfert des bactéries seules dans le milieu poreux, puis dans un second temps l'impact de celles-ci sur le transfert de métaux.

Dans ce contexte général, l'objectif principal de cette thèse est de contribuer à une meilleure compréhension du rôle des bactéries dans le transport des polluants métalliques dans les sols. Pour répondre à cet objectif général, nous avons développé une approche couplée :

- Dans la première partie, nous souhaitons caractériser les interactions métaux/bactéries par l'étude de la compartimentation subcellulaire du zinc et du cadmium chez deux bactéries modèles, *E. coli* K12Dh5a et *C. metallidurans* CH34. Cette étude a été réalisée selon un protocole mis au point lors de cette thèse permettant notamment d'identifier le rôle réel de la paroi cellulaire dans la rétention des métaux avec prise en compte de l'effet de l'état physiologique des cellules bactériennes (actives ou inactives) tel que l'on peut observer in situ.
- Dans un second temps, nous avons cherché à caractériser la dynamique du transfert facilité des métaux par les bactéries grâce à une approche de dynamique des systèmes en colonnes de laboratoire. Il s'agissait de caractériser dans un premier temps les mécanismes de transport des bactéries seules ou en mélange et celui des métaux seuls ou en mélange. Dans une optique de bioremédiation de sols pollués aux métaux lourds, nous avons étudié l'impact de la présence de bactéries sur le transfert de ces métaux. Ces études ont permis de déterminer la capacité des deux bactéries modèles, l'une sensible et l'autre résistante aux métaux, à mobiliser et/ou accélérer le transport du zinc et du cadmium dans un sable naturel réactif.
- Le lien entre ces deux parties a été fait en appliquant une modélisation du transport réactif des métaux, à l'aide d'un modèle couplant transport et géochimie. Les constantes de réactions nécessaires à cette modélisation ont été déterminées à partir des expériences d'étude des interactions bactéries métaux à l'échelle de la cellule et des expériences de transport réalisées avec les bactéries et les métaux seuls.
- L'originalité principale de ce travail est de développer une approche multi-échelle pour tenter de relier des mécanismes réactionnels à l'échelle cellulaire à des processus de transfert réactif à l'échelle de la colonne de sol. De plus nous avons essayé de nous rapprocher de la réalité en prenant en compte des effets de mélange de métaux et de bactéries ainsi que des états physiologiques représentatifs du terrain.

Le premier chapitre présente une revue bibliographique sur les interactions entre les métaux lourds et les bactéries, sur le transport des colloïdes en milieu poreux et sur la mise en évidence du transport réactifs de contaminants par les colloïdes dans les sols. Le second chapitre permet de présenter les modèles d'étude et décrit la méthodologie développée pour l'étude de la distribution subcellulaire des métaux dans les bactéries. Le troisième chapitre



concerne l'étude de la distribution subcellulaire du Cd et du Zn dans les deux bactéries modèles. Le quatrième chapitre concerne l'étude du transport des deux bactéries modèles dans le sable d'Hostun. Le dernier chapitre concerne le rôle des bactéries dans la mobilisation des métaux dans les sols ainsi que la modélisation associée à ces expériences.

## **CHAPITRE I – Introduction générale et objectifs**



## **I-1. Milieu poreux et colloïdes**

### **I-1-1. Définitions et origine des colloïdes**

Un milieu poreux est un milieu composé d'une structure solide et d'espace vides appelés pores. Ces pores peuvent être connectés ou non, et remplis partiellement ou totalement de gaz ou de liquide. Les sols sont des milieux poreux complexes créés en surface par divers processus (biologiques, géologiques et hydrologiques). Ils présentent une stratification verticale due à l'influence continue de l'eau qui y circule et des organismes vivants. Du point de vue chimique, les sols sont des systèmes biogéochimiques composés de trois phases : liquide, gazeuse et solide. La phase gazeuse est constituée d'air plus riche en CO<sub>2</sub> (transformations biologiques) que l'atmosphère terrestre. La phase liquide correspond à l'eau de pluie lessivant le sol et qui peut être plus ou moins enrichie en sels. Les aquifères correspondent à des milieux poreux saturés en eau, il n'y a alors que deux phases en présence (liquide et solide). La phase solide est constituée d'une fraction minérale et d'une fraction organique. Cette phase solide peut être séparée en deux fractions : une fraction immobile et une fraction potentiellement mobile, appelée fraction colloïdale.

Les colloïdes sont ubiquitaires dans l'environnement et peuvent être composés de phases minérales inorganiques (argiles, carbonates, oxydes de fer...), de biopolymères organiques (acides humiques et fulviques, polysaccharides...), de microorganismes et virus (biocolloïdes) ou être d'origine anthropique (nanoparticules) (Muris, 2004; Kretzchmar and Schäfer, 2005). Les colloïdes sont classiquement définis par leur taille, comprise entre 1nm et 1µm dans au moins une direction et une faible solubilité dans l'eau (Kretzschmar et al., 1999), voir Figure I-1. Ces caractéristiques leur confèrent une stabilité colloïdale qui leur permet de rester en suspension dans l'eau. De plus, les colloïdes présentent une réactivité très élevée du fait de leur grande surface spécifique (inversement proportionnelle à leur taille, 10-800 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) mais également du fait de la présence de nombreuses fonctions chimiques à leur surface (Kretzchmar and Schäfer, 2005).

Parmi les particules colloïdales réactives du sol, on distingue les biocolloïdes et notamment les bactéries. Ces dernières sont présentes à de fortes concentrations dans les sols, de 10<sup>6</sup> à 10<sup>10</sup> cellules par gramme de sol sec (Jocteur Monrozier et al., 1993; Martins et al., 1997; Yee et Fein, 2001). Il a été montré à de nombreuses reprises que les bactéries jouent un rôle majeur dans la séquestration, la transformation et la mobilisation des polluants ainsi que dans la participation aux cycles biogéochimiques (Gadd, 1992; Ledin, 2000, Guiné et al. 2003, Citeau et al. 2003). Depuis quelques années les particules colloïdales, et les microorganismes en particulier, sont soupçonnées de participer à la mobilité globale des métaux dans le sol.

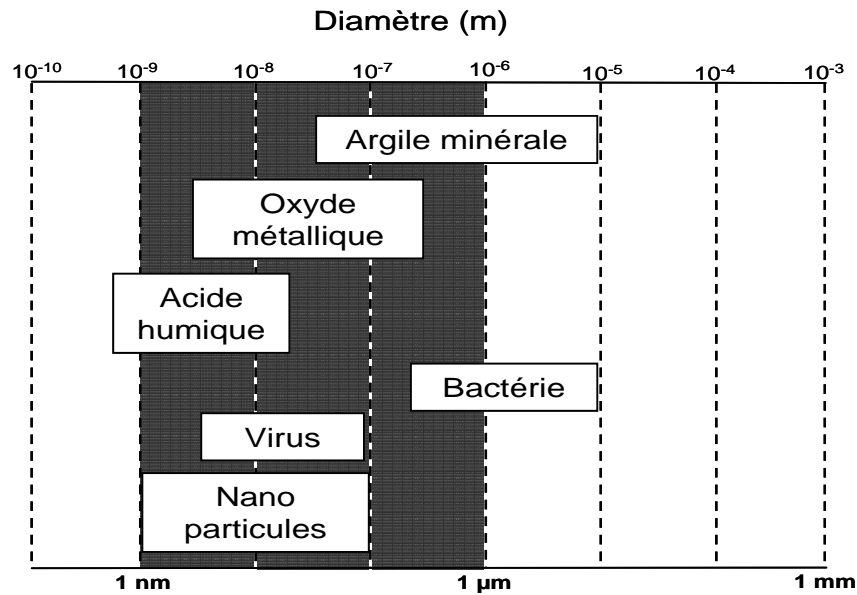


Figure I-1 Taille et diversité des particules colloïdales, d'après (Kretzschmar et al., 1999).

### I-1-2. Les colloïdes bactériens

Les bactéries sont des organismes de taille micronique visibles uniquement à l'aide d'un microscope. Antoine van Leeuwenhoek fut le premier à observer des bactéries, grâce à un microscope de sa fabrication, en 1668. Il les appela « animalcules » et publia ses observations dans une série de lettres qu'il envoya à la Royal Society. Le mot « bactérie » apparaît pour la première fois avec le microbiologiste allemand Christian Gottfried Ehrenberg en 1828. Ce mot dérive du grec *βακτηριον*, qui signifie « bâtonnet ». Au XIX<sup>e</sup> siècle, les travaux de Louis Pasteur ont révolutionné la bactériologie. Il démontra en 1859 que les processus de fermentation sont causés par des micro-organismes et que cette croissance n'était pas due à la génération spontanée. Il démontra aussi le rôle des micro-organismes comme agents infectieux. Pasteur conçut également des milieux de culture, des procédés de destruction des micro-organismes comme l'autoclave et la pasteurisation. Le médecin allemand Robert Koch et ses collaborateurs mirent au point les techniques de culture des bactéries sur milieu solide. Robert Koch est un des pionniers de la microbiologie médicale, il a travaillé sur le choléra, la maladie du charbon (anthrax) et la tuberculose. Il démontra de façon claire qu'une bactérie pouvait être l'agent responsable d'une maladie infectieuse et il proposa une série de postulats confirmant le rôle étiologique d'un micro-organisme dans une maladie. Les microbiologistes Martinus Beijerinck et Sergei Winogradsky initièrent les premiers travaux de microbiologie de l'environnement et d'écologie microbienne en étudiant les communautés microbiennes du sol et de l'eau et les relations entre ces microorganismes. En 1977, Carl Woese grâce à ses travaux de phylogénie moléculaire divisa les procaryotes en deux groupes : les *Bacteria* et les *Archaea*.

Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires procaryotes, dont la structure cellulaire ne comporte pas de noyau. Les bactéries sont ubiquitaires et sont présentes dans tous les types d'écosystèmes mais également dans les êtres vivants. Les bactéries ont une importance considérable dans les cycles biogéochimiques comme par exemple le cycle du carbone et la fixation de l'azote de l'atmosphère. La très grande majorité des bactéries sont inoffensives ou bénéfiques pour l'organisme. Il existe cependant des espèces pathogènes à l'origine de beaucoup de maladies infectieuses (le choléra, la syphilis, la peste, l'anthrax, la tuberculose). De plus les bactéries présentent des propriétés biotechnologiques intéressantes.

Elles sont notamment utilisées dans l'agroalimentaire lors de la fabrication des yaourts ou du fromage et dans la production industrielle de nombreux composés chimiques. Plus récemment les industriels et scientifiques se sont intéressés aux capacités des microorganismes pour décontaminer les sols et eaux pollués.

### I-1-3. Propriétés de surface des bactéries

La connaissance des propriétés de surfaces des bactéries est une étape nécessaire à la compréhension du rôle joué par les bactéries dans les différents processus auxquels elles participent. Pour cela il faut s'intéresser à la géométrie des cellules, la structure de leur paroi, leur capacité à échanger des protons ou à retenir des cations, leur propriété d'hydrophobie ainsi que leur charge de surface.

#### I-1-3-1. Structure et géométrie des bactéries

On trouve dans le sol de nombreuses espèces bactériennes qui se distinguent les unes des autres par leur morphologie, leur composition chimique, leur mode de vie et de nombreux autres facteurs, comme leur fonction dans un écosystème. Les morphologies bactériennes peuvent être très variées. Les cellules peuvent être courtes, pratiquement sphériques (cocci ou coques) ou allongées (bacilles). Les bacilles sont essentiellement des cylindres à extrémités hémisphériques mais on en connaît aussi à extrémités fines, pointues (formes en fuseau) ou au contraire planes (bacilles dits « à bouts carrés»). Certains corps bacillaires sont incurvés ou spiralés.

Afin de se protéger des variations de l'environnement (pression osmotique, température, teneur en oxygène, eau...) les bactéries ont développé une paroi cellulaire particulière. La paroi est une structure rigide et résistante qui entoure le cytoplasme et sa membrane et lui donne sa forme (Figure I-2).

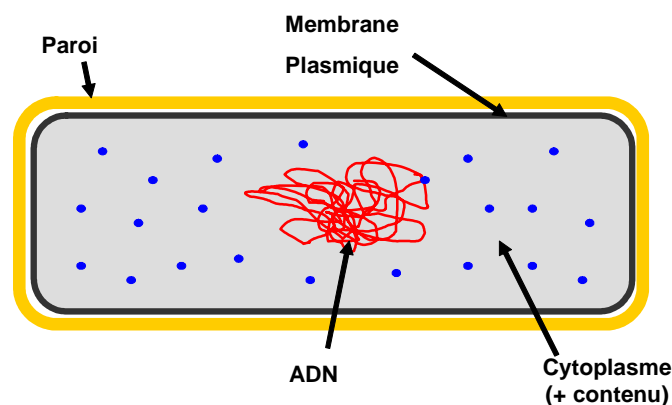


Figure I-2 : Schéma d'une cellule bactérienne.

Malgré les variations structurales, la paroi des bactéries contient une molécule originale, le peptidoglycane. Celui-ci constitue une structure très rigide autour de la cellule, c'est un véritable exosquelette responsable de la forme des bactéries. Ce réseau est composé de chaînes de glycanes reliées entre elles par des chaînons peptidiques. La densité du réseau de peptidoglycane (PG) permet de distinguer deux types de bactéries : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.

– La paroi des bactéries à Gram positif (Figure I-3) est principalement constituée de peptidoglycane qui constitue un réseau épais, il s'y ajoute également d'autres constituants,

notamment des grandes chaînes de polymères secondaires. Les acides teichoïques sont associés au réseau de peptidoglycane et atteignent la surface externe et constituent des antigènes importants. D'autres constituants sont également présents chez certaines espèces : protéines, polysaccharides qui peuvent jouer un rôle important dans les propriétés antigéniques ou dans le pouvoir pathogène.

– La paroi des bactéries à Gram négatif apparaît hétérogène. On distingue une couche interne et une membrane externe, séparées par un espace périplasmique (Figure I-3). La couche interne contient du peptidoglycane qui recouvre la membrane cytoplasmique et dont la structure est comparable à celui des bactéries à Gram positif. Toutefois, il ne contient jamais d'acides téchoïques. Il est le squelette de l'enveloppe et il joue un rôle essentiel pour l'intégrité cellulaire. L'espace périplasmique contient des lipoprotéines qui relient la membrane externe au peptidoglycane et qui participent à la cohésion de la paroi. La membrane externe est constituée d'une double couche phospholipidique dans laquelle flottent des lipopolysaccharides (LPS) et des protéines. Les lipopolysaccharides sont des molécules complexes jouant un rôle important dans les propriétés antigéniques (antigène O) et dans le pouvoir pathogène (endotoxine). Cette membrane externe constitue une barrière qui protège la bactérie mais qui ne s'oppose pas au passage de toutes les molécules. Sa perméabilité est assurée par des protéines membranaires (les porines).

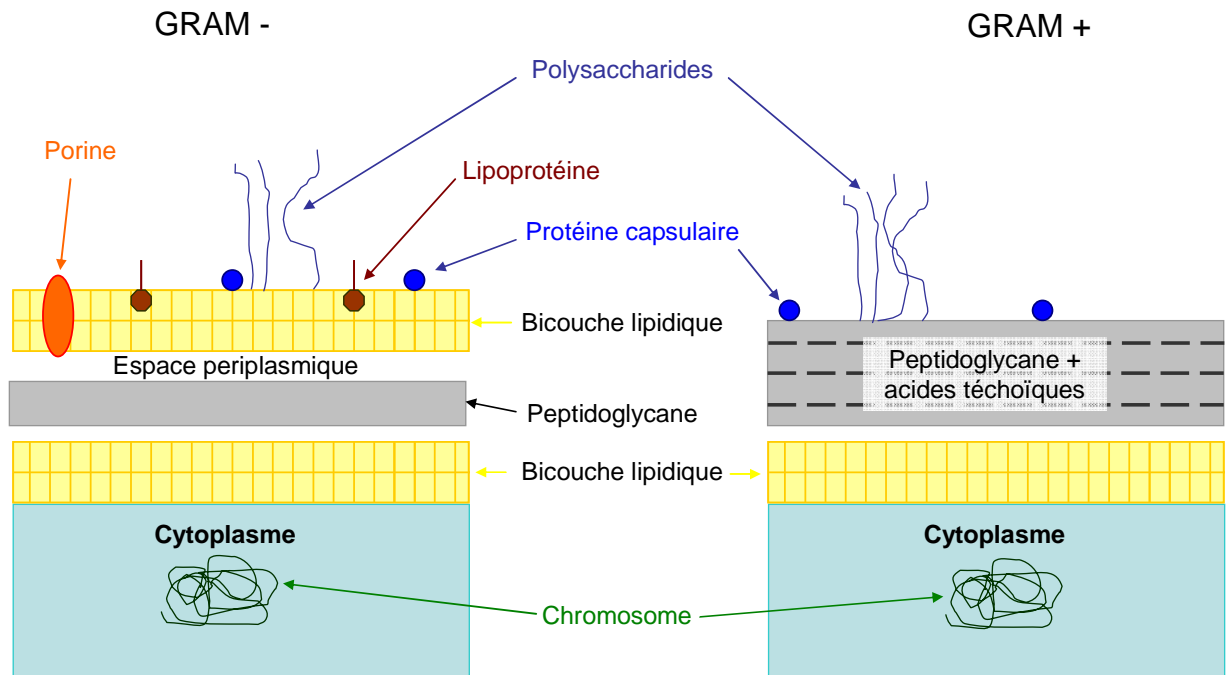


Figure I-3: Schématisation des deux types de parois cellulaires bactériennes à Gram positif et négatif.

Selon les conditions environnementales les bactéries peuvent s'entourer d'enveloppes supplémentaires plus ou moins structurées ou diffuses. De très nombreuses bactéries sont capables de synthétiser des substances polymériques extracellulaires (EPS) à leur surface qui peuvent, éventuellement, être libérées dans le milieu. Ces polymères sont élaborés de manière préférentielle lorsque les bactéries sont dans un milieu hostile car ils apportent une protection ou un moyen de coloniser l'environnement. Parmi les polysaccharides de surface, on peut distinguer la capsule et les couches muqueuses ou slime. La capsule correspond à une structure bien organisée, facilement mise en évidence par des techniques simples alors que le slime correspond à des constituants polysaccharidiques plus ou moins libérés dans le milieu et ne constituant plus une véritable entité morphologique. Ces structures sont très réactives et leur développement conduit à la formation d'un assemblage, complexe, stable, structuré et

très réactif appelé biofilm (Muris, 2004). Les biofilms sont très répandus dans les milieux naturels et permettent aux bactéries de se protéger des environnements hostiles.

### **I-1-3-2. Hydrophobie et charge de surface**

Le comportement des colloïdes bactériens dans l'environnement - du fait de la présence d'eau, notamment dans les sols - est fortement influencé par leur hydrophobie de surface. La plupart des surfaces bactériennes sont globalement hydrophobes, cela résulte des propriétés conférées par les constituants membranaires, notamment lipidiques (Rosenberg and Kjelleberg, 1986). Cependant, certains constituants membranaires présentent à la fois des propriétés hydrophobes et hydrophiles ce qui induit une forte variabilité du caractère hydrophobe/hydrophile apparent des cellules bactériennes (van Loosdrecht *et al.*, 1987b; Otto *et al.*, 1999; Foppen and Schijven, 2006). Les protéines de surface, les acides lipotéichoïques et les LPS confèrent des propriétés hydrophobes aux surfaces (Mattos-Guaraldi *et al.*, 1999). Les phospholipides possèdent une « tête » hydrophile et des « queues » hydrophobes. A ces effets structuraux sur les propriétés d'hydrophobie des cellules bactériennes, s'ajoutent des contraintes abiotiques telles que le pH, la température ou la force ionique de la solution qui contrôlent la réactivité des surfaces bactériennes qui, par conséquent, peuvent modifier également le caractère hydrophobe apparent des cellules.

La charge de surface n'est pas mesurée directement mais elle peut être estimée soit par la mesure de la mobilité électrophorétique (vitesse de déplacement des particules soumises à un champ électrique), soit calculée à partir des différents modèles en se basant sur les concentrations des espèces adsorbées. Dans les milieux faiblement concentrés, une mesure de la mobilité électrophorétique des particules permet d'estimer le potentiel Zêta ( $\zeta$ ), représentatif de la charge effective de la particule (charge « particule + couche diffuse »). Le pH ( $\text{pH}_{\text{pzc}}$ ), pour lequel la charge de surface est nulle ( $\sum \text{charges positives} = \sum \text{charges négatives}$ ) est d'un intérêt particulier, car il n'y a plus de répulsion électrique entre les différentes particules. Dans le cas de la mobilité électrophorétique, ce pH est appelé point isoélectrique (PIE). Les valeurs de  $\text{pH}_{\text{pzc}}$  ou du PIE varient du fait de l'adsorption spécifique des cations ou anions à la surface des particules ou du fait de la présence d'hétérogénéités ou d'impuretés de surface. Ainsi, la charge de surface des colloïdes est nulle lorsque le pH du milieu est égal à celui de leur PIE ; négative lorsque le pH est supérieur et positive lorsque le pH est inférieur. Pour des pH « environnementaux », compris entre pH 4 et 8, la plupart des cellules bactériennes possèdent une charge de surface négative (Rosenberg and Doyle, 1990). Le potentiel Zêta, en plus de la charge effective d'une particule, renseigne sur la stabilité des suspensions colloïdales.

## **I-2. Réactivité des bactéries vis-à-vis des éléments traces**

### **I-2-1. Les éléments traces métalliques (ETM) dans l'environnement**

L'appellation métaux lourds est une appellation courante qui n'a ni fondement scientifique, ni application juridique. Les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, mais en général en très faibles quantités. On dit que les métaux sont présents “ en traces ”. La classification en métaux lourds est d'ailleurs souvent discutée car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement “ lourds ” (le zinc par exemple), tandis que certains éléments toxiques ne sont pas tous des métaux (l'arsenic par



exemple). Pour ces différentes raisons, la plupart des scientifiques préfèrent à l'appellation métaux lourds, l'appellation “ éléments en traces métalliques ” (ETM) ou par extension “ éléments traces ”.

On appelle éléments traces les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes, caractérisés par une masse volumique élevée, supérieure à  $5 \text{ g.cm}^{-3}$ . Quarante et un métaux correspondent à cette définition générale auxquels il faut ajouter cinq métalloïdes. Beaucoup d'ETMs sont indispensables aux processus biologiques : par exemple le fer est un composant essentiel de l'hémoglobine, le zinc, le cuivre sont des oligo-éléments indispensables... Tous les ETMs sont présents naturellement à l'état de traces dans les sols. L'activité humaine peut avoir renforcé cette présence étant donné que nombre d'ETMs jouent un rôle important dans la vie quotidienne :

- le fer et ses alliages, aciers, aciers inoxydables,
- le plomb pour les batteries d'accumulateurs, les tuyauteries, les soudures, les peintures anti-corrosion et les munitions, les grenailles de plomb...
- le mercure pour de très nombreux usages dont les amalgames dentaires et les piles électriques,
- le chrome comme pigment rouge et pour le chromage de pièces,
- le cuivre dans le domaine de l'électronique et des traitements phytosanitaires,
- l'argent pour la bijouterie et l'argenterie, la photographie argentique, de nombreux usages industriels, les monnaies et médailles,
- l'or pour la bijouterie, les objets précieux, les contacts électriques, en dentisterie,
- le zinc pour la galvanisation de l'acier, et pour des pièces moulées utilisées dans l'automobile et sa présence dans les pneumatiques,
- le nickel pour les aciers inoxydables...

L'activité humaine n'a apporté aucun changement dans les volumes de métaux lourds, car les métaux sont non biodégradables. Pendant le 20<sup>ème</sup> siècle, elle a surtout changé la dispersion des métaux, les formes chimiques (ou spéciations) et les concentrations par l'introduction de nouveaux modes de dispersion (fumées, égouts, voitures...). Si une partie des métaux lourds part directement dans le sol et les eaux, l'essentiel est d'abord émis dans l'atmosphère avant de rejoindre les deux autres compartiments (Sigg et al., 2001). Même si les concentrations de métaux lourds dans les sols paraissent beaucoup moins importantes que celles relevées dans les sédiments, la contamination des sols constitue un enjeu fondamental non seulement parce qu'il affecte notre environnement proche, mais aussi et surtout parce que l'enjeu de la pollution des sols est directement lié à l'alimentation en eau potable.

La toxicité des métaux lourds a conduit les pouvoirs publics à réglementer les émissions en fixant des teneurs limites. Cette réglementation n'est cependant d'aucun secours pour déterminer sans ambiguïté une liste de métaux à surveiller car la liste varie selon les milieux considérés : émissions atmosphériques, rejets dans l'eau, règles sur l'épandage des boues ou la mise en décharge... L'arrêté du 2 février 1998, relatif aux installations classées pour la protection de l'environnement, fixe notamment les émissions de toute nature que doivent respecter ces installations. L'arrêté ne définit pas les « métaux lourds » mais sélectionne un certain nombre de métaux soumis à des contraintes environnementales, en l'espèce le respect de limites d'émission dans l'eau. Douze métaux sont concernés : Aluminium, Arsenic, Cadmium, Chrome, Cuivre, Etain, Fer, Manganèse, Mercure, Nickel, Plomb, Zinc. D'autres réglementations sont plus restrictives. La réglementation n'est donc d'aucun secours et contribue même à entretenir l'ambiguïté (7, 12 ou 15 métaux soumis à des contraintes environnementales). Difficulté supplémentaire, dans son rapport sur les éléments en France,

l'Académie des Sciences ne prend en considération que neuf éléments, classés en « éléments en traces » : Arsenic, Cadmium, Chrome, Cuivre, Mercure, Nickel, Plomb, Sélénium et Zinc (Miquel, 2001).

Il existe néanmoins une constante. Parmi les métaux lourds, on distingue principalement trois d'entre eux : le mercure, le plomb et le cadmium qui ont quelques caractéristiques physicochimiques communes :

- ils se transportent, changent de forme chimique, mais ne se détruisent pas
- ils ont une conductivité électrique élevée, qui explique leur utilisation dans de nombreuses industries
- mais surtout, ils présentent une certaine toxicité pour l'homme, entraînant notamment des lésions neurologiques plus ou moins graves. Tandis que tous les autres ont une utilité dans les processus biologiques - certains métaux (les oligoéléments) sont même indispensables à la vie (le fer, le cuivre, le nickel, le chrome...) - les trois métaux cités sont des éléments sans utilité biologique connue et donc toxiques même à faible concentration.

Les teneurs en huit éléments traces ont été déterminées dans les sols agricoles Français suite à une collecte de données à l'échelon national par Baize et al. (2007) (Tableau I-1).

**Tableau I-1: Teneur en huit éléments traces dans les sols agricoles français en mg.kg<sup>-1</sup> de sol sec (Baize et al., 2007).**

	<b>Cd</b>	<b>Cr</b>	<b>Cu</b>	<b>Hg</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>	<b>Se</b>	<b>Zn</b>
Nombre d'échantillons	<b>10634</b>	11117	11118	8798	11275	11160	8193	<b>11161</b>
Mediane	<b>0.3</b>	37.6	13.8	0.05	20.4	25.6	0.2	<b>59</b>
Moyenne	<b>0.39</b>	41.6	17.4	0.08	24.1	30.4	0.26	<b>68</b>
Maximum	<b>17.1</b>	2262	663	11.6	1333	1560	9.2	<b>2707</b>
Seuil réglementation	<b>2</b>	150	100	1	50	100	10	<b>300</b>

Dans notre étude, nous nous intéresserons plus particulièrement à deux métaux de toxicité différente : le zinc (Zn), un oligoélément toxique uniquement à forte concentration et le cadmium (Cd), un métal qui n'a aucune fonction biologique connue et qui est toxique à faible concentration.

## **I-2-2. Interactions entre les bactéries et les métaux dans l'environnement**

### **I-2-2-1. Généralités**

Certains métaux sont essentiels pour les microorganismes (K, Na, Mg, Ca...) et participent au fonctionnement des cellules. Dans certaines réactions catalytiques indispensables pour le fonctionnement de l'organisme, des métallo-enzymes ont besoin d'un ion métallique comme atome central. De plus, afin de générer de l'énergie, de nombreux microorganismes dépendent des composés métalliques comme donneurs d'électrons pour le métabolisme, le chimiotropisme et comme accepteurs d'électron pendant la respiration anaérobie. Il est courant de trouver des métaux à la surface des bactéries. En effet les ions métalliques sont un composant important des parois bactériennes (Beveridge, 1989). Il a été

montré que les ions divalents étaient fortement présents dans les parois de deux bactéries (*B. subtilis* 168 et *B. licheniformis* NCTC 6346). Le magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et le calcium ( $Ca^{2+}$ ) semblent être les métaux les plus abondants, d'autres métaux en quantité moindre ont également été observés. Ces métaux sont fortement liés aux acides téichoïques et au peptidoglycane. Les ions métalliques peuvent également affecter l'organisation des phospholipides et des lipopolysaccharides à l'extérieur de la membrane et peuvent même affecter les forces de liaisons entre les différentes parties de la membrane. En revanche certains éléments métalliques (Al, Ag, Cd, Sn, Hg...) sont toxiques pour les organismes. Malgré la présence d'ions toxiques, certains microorganismes sont capables de survivre dans des milieux pollués. Cette capacité peut être le résultat de mécanismes induits ou intrinsèques aux individus (Gadd, 1992). Pour les microorganismes, Gadd (1992) définit la tolérance comme la capacité de faire face à la toxicité des métaux au moyen des propriétés intrinsèques des organismes. En parallèle, il décrit la résistance comme la capacité à survivre aux métaux toxiques par des mécanismes de détoxification en réponse directe à la présence de métaux dans l'environnement. Dans la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons dans un premier temps à la réactivité générale des bactéries vis-à-vis des métaux puis, dans un second temps, aux différents mécanismes adaptatifs développés par les bactéries pour se protéger de la toxicité des métaux.

#### **I-2-2-2. Réactivité des bactéries vis à vis des métaux**

Les microorganismes, en particulier les bactéries, peuvent interagir avec les métaux via différents mécanismes (Ledin, 2000). On peut observer une transformation des métaux par des processus d'oxydation/réduction ou d'alkylation. Ces modifications modifient généralement la toxicité et la mobilité du métal d'origine. Les métaux peuvent également être accumulés par des phénomènes d'adsorption passive (indépendante du métabolisme) ou par transport actif à l'intérieur de la cellule (dépendante du métabolisme). Il a également été observé la production par les microorganismes de substances telles que des composés organiques ou des sulfides, par exemple, qui modifient la solubilité, et donc la mobilité des métaux. De plus, de par leur participation aux cycles biogéochimiques, les microorganismes modifient les caractéristiques de la matière organique dans leur environnement, ce qui peut modifier le comportement des métaux via des mécanismes de chélation ou complexation. Enfin les bactéries peuvent influencer de manière indirecte la mobilité des métaux par des modifications du milieu, par exemple par acidification. Ces différents mécanismes sont résumés dans la Figure I-4.

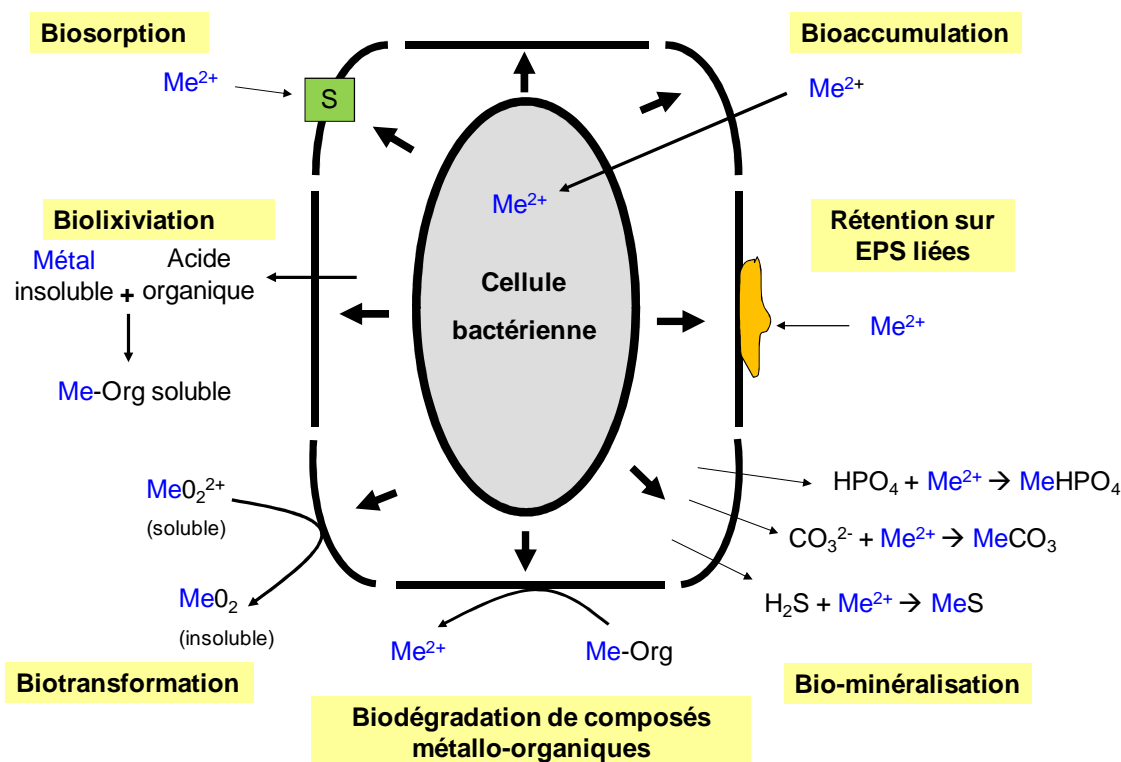


Figure I-4: Schématisation des interactions entre métaux et bactéries (adaptée de Ledin, 2000). S correspond aux groupements réactifs présents sur la paroi bactérienne.  $Me^{2+}$  correspond à un cation métallique. Org correspond à un composé organique.

Les interactions entre les cellules bactériennes et les métaux sont gouvernées par des mécanismes passifs ou actifs (Chang, 1997; Haferburg and Kothe, 2007).

- Les premiers sont indépendants du métabolisme et donc de l'état physiologique des cellules (vivantes ou mortes), ils sont rapides et réversibles. Ils ont lieu à l'interface cellule/solution et mettent en jeu des mécanismes tels que l'échange ionique, la complexation de surface ou la précipitation.
- Les seconds dépendent, eux, du métabolisme des cellules et sont donc spécifiques à chaque souche bactérienne, ils sont plus lents et généralement inducibles.

Ces interactions passives et actives vont dépendre de la structure cellulaire et peuvent intervenir simultanément. D'une manière générale, on considère que les métaux lourds peuvent être fixés dans la structure cellulaire et conséquemment biosorbés sur des sites de liaisons. Ceci est indépendant du métabolisme et est connu sous le terme de biosorption ou « passive uptake » (Malik, 2004). Les métaux peuvent également pénétrer les cellules en passant la membrane par l'intermédiaire du métabolisme. Ce mode d'assimilation est connu sous le terme d'assimilation ou « active uptake » (Malik, 2004). Ces deux modes d'interaction sont plus généralement regroupés sous le terme de bioaccumulation. Chez les cellules métaboliquement actives, l'assimilation se fait en deux phases. Une phase initiale de biosorption rapide suivi d'une phase plus lente d'assimilation active dépendante du métabolisme et des métaux considérés. La plupart des études sur la biosorption des métaux sur les cellules bactériennes ont été réalisées sans prendre en compte l'effet de l'activité physiologique des cellules.

### Association passive avec la paroi cellulaire ou biosorption

Avec  $10^6$ - $10^9$  cellules  $g^{-1}$ , les bactéries représentent le plus grand nombre d'organismes dans les sols. En raison de leur petite taille, les bactéries présentent un ratio surface/volume important qui leur confèrent donc une grande surface de contact pour interagir avec l'environnement. En plus de ces caractéristiques, c'est plus particulièrement la charge nette négative de leur enveloppe cellulaire qui fait que ces organismes sont capables de fixer et d'accumuler les cations métalliques dans l'environnement. La paroi des cellules bactériennes présente de nombreux composants, encore appelés groupements fonctionnels, susceptibles de réagir avec les constituants extérieurs. En effet étant en contact avec le milieu extérieur les différents composants présents sur la couche externe des cellules sont des lieux d'interactions privilégiés avec l'environnement (ions, métaux, pesticides, composants du sol...). Les groupes fonctionnels présentent des fonctions anioniques au niveau de la surface bactérienne, qui vont être les principaux responsables de la capacité des bactéries à fixer les métaux. Différentes techniques ont été utilisées afin de caractériser les groupements fonctionnels des cellules bactériennes (titrations acide-base, spectroscopie EXAFS, ATR-FTIR...) (Fein et al., 1997; Yee and Fein, 2001; Guiné et al., 2006, 2007; Mishra et al., 2009). Cox et al. (1999), ont établi une liste des principaux sites réactifs et leur localisation au niveau des parois bactériennes présentées et décrites dans le Tableau I-2 ci-dessous :

**Tableau I-2: Principaux groupements fonctionnels et constituants membranaires chez les bactéries (d'après Cox et al., 1999).**

Groupements fonctionnels	Constituants membranaires
carboxyles R-COOH	acides lipotéichoïques LPS EPS
phosphomonoesters R-OPO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	acides teichoïques LPS EPS
phosphodiester (RO) <sub>2</sub> -P(OH) <sub>2</sub>	peptidoglycane phospholipides
amines R-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	peptidoglycane phospholipides
hydroxyles R-OH	peptidoglycane

– Les lipopolysaccharides (LPS) sont des chaînes de molécules évoluant à l'extérieur des cellules. Ils sont composés d'un lipide A commun sur lequel est fixé un polysaccharide qui contient des groupes carboxyles et phosphomonoesters.

– Les phospholipides sont composés de chaînes hydrophobes attaché à une unité glycérol sur laquelle est attaché un groupe hydrophile. Sur ce dernier on trouve deux sites réactifs (des fonctions amines et phosphodiester).

– Le réseau de peptidoglycane (PG) est une structure rigide composée de deux molécules de sucres liées à un tétrapeptide. Il contient trois fonctions carboxyles et une amine.

Guiné et al. (2006) ont proposé un schéma des différents groupements fonctionnels de la membrane d'*E. coli* (Figure I-5).

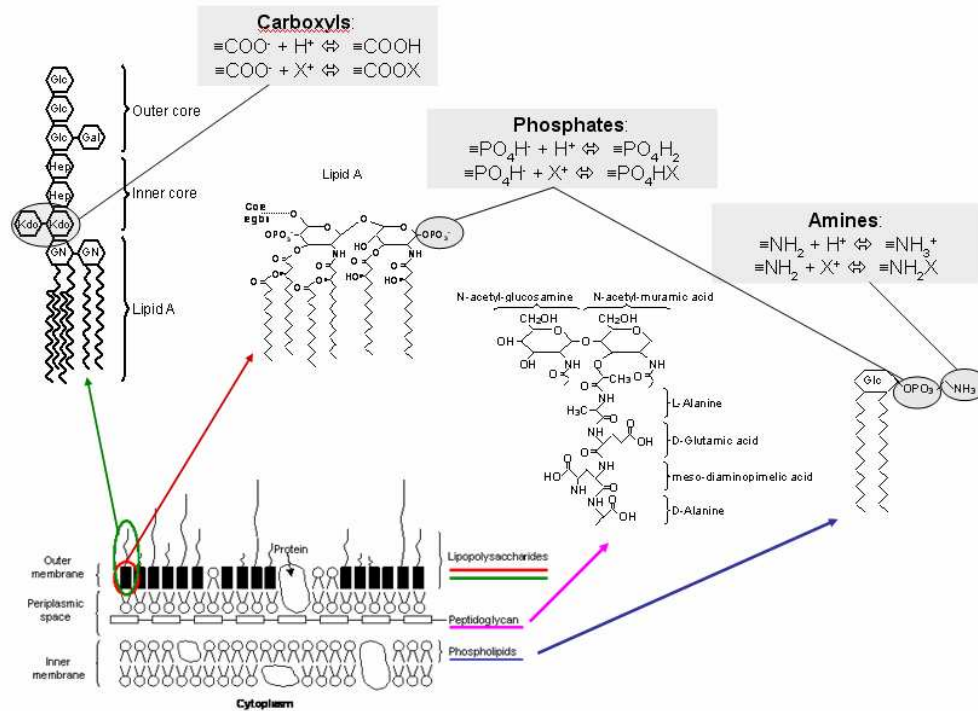
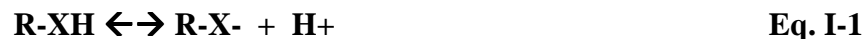


Figure I-5: schématisation des différents groupements fonctionnels de la membrane d'*E. coli* (d'après Guiné et al. 2006).

Il a également été montré que les différences constitutives de paroi entre les cellules à Gram+ et Gram- semblent avoir une influence mineure sur les capacités de sorption des métaux (Yee and Fein, 2001; Ngwenya et al., 2003). Ainsi, Fein et al. (1997) ont proposé un modèle de complexation universel des métaux avec trois sites de surface : carboxyles, phosphates et hydroxyles ou amines. La déprotonation successive des groupements fonctionnels avec l'augmentation du pH expliquerait le comportement acido-basique des surfaces bactériennes. La déprotonation des sites suit l'équilibre acido-basique suivant :

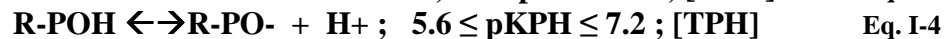
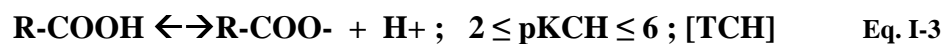


Où R correspond à la surface bactérienne et XH au groupement fonctionnel de surface protoné.

On peut alors définir la constante de réaction suivante :

$$K = \frac{[R-X^-]a_{H^+}}{[R-XH]} \quad \text{Eq. I-2}$$

et  $pK = -\log(K)$ . Avec  $a$ , l'activité des espèces en solutions. Chacun des trois sites fonctionnels peut être représenté par une constante de stabilité et une concentration en site réactifs (Ngwenya et al., 2003):



Récemment des analyses en spectroscopie EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure) ont été réalisés afin de déterminer plus précisément les groupes fonctionnels impliqués dans la biosorption des métaux (Kelly et al., 2001; Guiné et al., 2006; Ueshima et al., 2008; Mishra et al., 2009). Cette technique consiste en une analyse de spectrométrie d'absorption des rayons X en utilisant principalement le rayonnement synchrotron. Elle apporte des informations sur l'environnement atomique d'un élément donné. Les résultats obtenus ont permis de confirmer le rôle des groupements fonctionnels présentés ci-dessus. Cette technique a également permis de mettre en évidence l'intervention de sites réactifs membranaires impliquant le soufre dans la rétention du zinc et du cadmium (Guiné et al. 2006). Ces derniers interviendraient notamment dans la fixation du zinc à faible concentration. De même, Mishra et al. (2009) ont également mis en évidence la participation de groupements sulfhydryle dans la fixation du cadmium par des consortiums bactériens. A partir des résultats obtenus en EXAFS, des schémas de structures moléculaires ont été proposés par Guiné (2006) pour le zinc et le cadmium en fonction de la concentration métallique et sont présentés dans la Figure I-6.

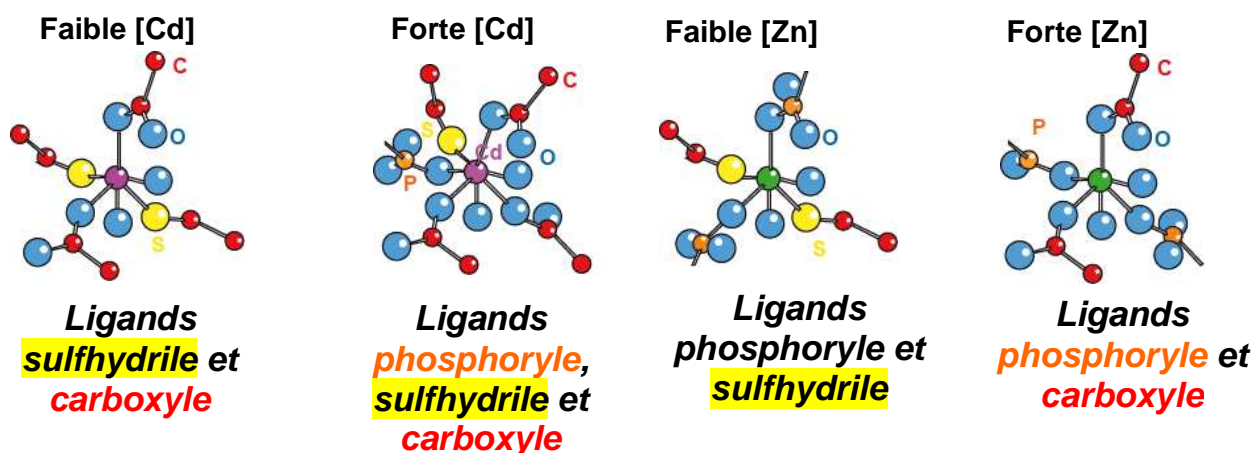


Figure I-6: Schématisation des structures moléculaires des ligands des surfaces bactériennes impliqués dans la biosorption du zinc et du cadmium en fonction de la concentration en métal (Guiné, 2006).

### Accumulation intracellulaire ou active uptake

Les métaux essentiels sont prélevés activement par les bactéries, sous forme ionique, pour répondre à un besoin physiologique propre (métabolisme, réponse à un stress). Ce prélèvement se fait en deux temps : les ions métalliques sont initialement adsorbés à la surface extracellulaire (mécanisme passif) comme expliqué précédemment puis des systèmes de transport spécialisés (protéines de transport), qui s'accompagnent en général d'une dépense d'énergie (hydrolyse d'ATP) sont activés pour faire entrer le métal à l'intérieur de la cellule (mécanisme induit) (Nies, 1999). Du fait des similitudes entre les métaux, les non essentiels peuvent suivre accidentellement la même voie que les métaux essentiels, ce qui explique en partie la toxicité des métaux. L'internalisation est l'étape clé du mécanisme d'assimilation des métaux. La formation de complexes entre le métal et les groupements fonctionnels anioniques est un pré-requis à l'assimilation des métaux par les microorganismes. Une fois le métal sorbé, il peut alors être transporté dans l'espace périplasmique et éventuellement dans le cytoplasme. Cela fait intervenir de nombreuses réactions de complexation et des molécules nécessaires pour le transport, le stockage, des liaisons de surface et les fonctions biologiques. On distingue 3 grandes familles de transporteurs qui sont décrites ci-après : ATPases / RND / CDF (Nies, 1999; Worms et al., 2006; Haferburg and Kothe, 2007).

### I-2-3. Stratégies de survie des bactéries résistantes

Les métaux qui n'ont pas de fonction biologique sont généralement tolérés à faibles concentrations, alors que les métaux essentiels sont acceptés à plus forte concentration (Bruins et al., 2000). Ces derniers participent au fonctionnement métabolique des cellules en tant que constituants d'enzymes ou constituants structurels (exemple de la membrane). La concentration et la spéciation du métal déterminent si celui-ci est utile ou nocif à la cellule (Sigg et al., 2001). Le contrôle des concentrations internes, ou homéostasie, s'avère donc nécessaire. C'est pourquoi les bactéries ont développé différentes stratégies de défense pour se protéger de la toxicité des métaux :

- De nombreuses bactéries sont désormais connues pour leur capacité à excréter les métaux par des systèmes d'efflux. Ces types de transporteurs se caractérisent par une forte affinité au substrat et permettent de maintenir de faibles concentrations métalliques dans le cytosol (Mergeay et al., 1987; Nies and Silver, 1995; Nies, 2003). L'un des exemples les plus connus est la bactérie *C. metallidurans* CH34 qui a fait l'objet de nombreuses études. Trois grandes familles de protéines responsables de l'efflux chez les microorganismes (Nies, 2003) ont été décrites :

- les protéines de la famille « **resistance-nodulation-cell division** » (RND) dont la première découverte fut la protéine *CzcCBA* de la bactérie *C. metallidurans* (Saier et al., 1994) chez laquelle le plasmide pMOL30 permet la résistance au cobalt, zinc et cadmium (*czc*) via un mécanisme d'efflux. De même pour la protéine permettant la résistance au cobalt et nickel (*cnr*) porté par le plasmide pMOL28. L'efficacité de ce système serait due au fait que non seulement il permet de diminuer la concentration cytoplasmique mais également la concentration périplasmique. Dans ce cas les cations peuvent être excrétés avant même leur entrée dans la cellule (Nies, 2003).

- la famille « **cation diffusion facilitators** » (CDF) dont les substrats principaux sont le zinc, cobalt, nickel, cadmium et le fer. Ces systèmes d'efflux sont contrôlés par le gradient de concentration. Toutes les protéines CDF décrites chez les bactéries sont impliquées dans la résistance au Zn. C'est le cas de la protéine *CzcD* chez *C. metallidurans* CH34. Chez *E. coli*, la protéine *ZitB* a été mise en évidence pour son implication dans la résistance au Zn (contrôlée par le gradient de potassium et la « force motrice protonique »), l'expression de cette protéine est induite par la présence de Zn. Les protéines de la famille CDF sont généralement responsables de l'efflux des métaux présents dans le cytoplasme (Nies, 1999).

- la troisième grande famille impliquée dans l'efflux de métaux est celle des « **P-type ATPases** » qui forment une grande famille de transporteurs actifs dont l'énergie provient de l'hydrolyse de l'ATP. Il existe des ATPases qui importent et d'autres qui vont exporter les métaux. Par exemple les Zn-CPx-type ATPases impliquées dans le transport de Zn, Cd et Pb principalement du cytoplasme vers le milieu extérieur ou le périplasma. La première protéine décrite fut *CadA*, qui est impliquée dans l'efflux de Cd, découverte chez *S. aureus* (Nies, 2003).

- Les microorganismes peuvent produire et rejeter vers l'extérieur des substances organiques (EPS) ou inorganiques (métabolites) qui sont susceptibles de modifier la mobilité des métaux soit en les immobilisant (précipitation, adsorption) soit en les (re-) mobilisant (solubilisation) (Chen et al., 1995). Ce mécanisme est souvent décrit comme du « bioweathering » ou biolixiviation (Gadd, 2009; Gilmour et Riedel, 2009; Uroz et al., 2009). Le rôle des substances polymériques extracellulaires (EPS) est décrit plus en détails dans le paragraphe I-2-4.

- Si les métaux toxiques sont entrés dans la cellule et ne peuvent pas être excrétés par des systèmes d'efflux, plusieurs organismes ont développé des mécanismes de

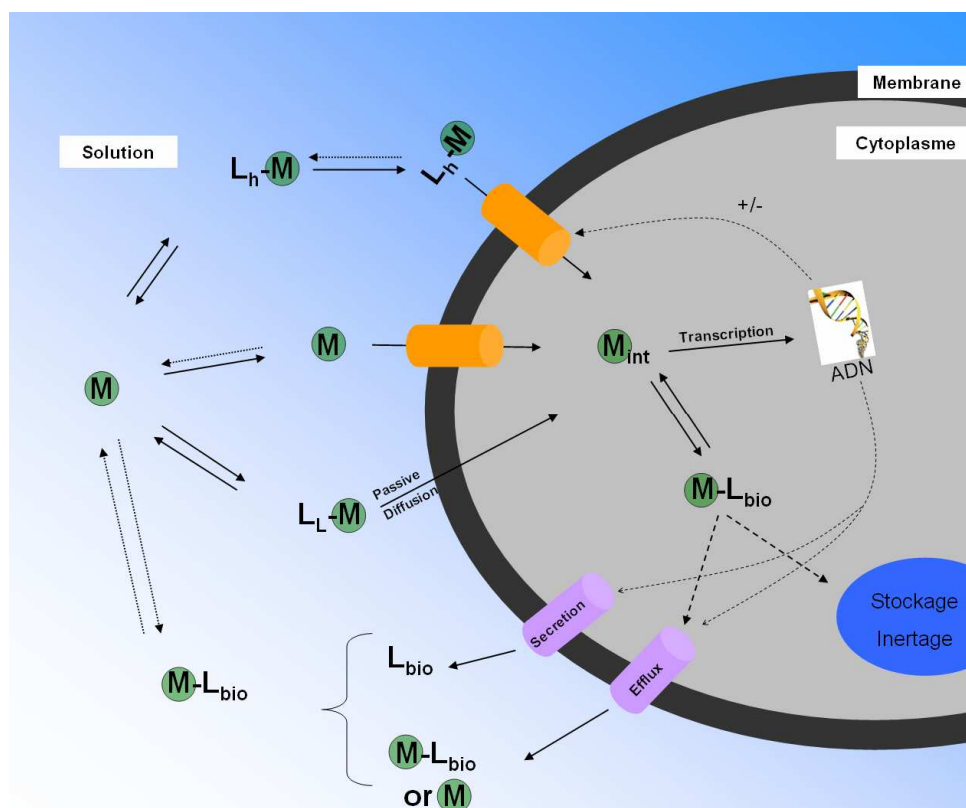


séquestration cytosolique pour se protéger. Il a été montré chez beaucoup d'organismes résistants aux métaux que des composés internes comme, par exemple, des granules de polyphosphates ou des groupements thiols (contenant du soufre), étaient capables de séquestrer des grandes quantités de cations métalliques (e.g. Keasling et al., 1998; Finlay et al., 1999; Gadd, 2000; Pagès et al., 2007). La bioaccumulation de métaux lourds et leur stockage subséquent dans la cellule sous forme inerte permet à la cellule de diminuer leur toxicité. C'est par exemple le cas chez *C. metallidurans* CH34 qui réduit le sélénite sous forme de sélénium élémentaire (rouge) et l'accumule sous forme de nodules dans le cytoplasme (Roux et al., 2001; Sarret et al., 2005).

- La précipitation extracellulaire intervient quand les microorganismes produisent ou sécrètent des substances qui réagissent avec les métaux solubles pour produire un composé métallique insoluble. Les métabolites inorganiques tels que des ions sulfate, carbonate ou phosphate issus principalement du métabolisme respiratoire peuvent précipiter des ions métalliques toxiques. La formation de sulfures métalliques par les bactéries sulfato-réductrices (sédiments anoxiques, sols faiblement aérés) est par exemple l'un des processus d'immobilisation microbiologique les plus connus (Ledin, 2000). Pour être efficace, la co-précipitation doit diminuer de façon conséquente la concentration en éléments dissous, c'est-à-dire en dessous de la concentration pour laquelle la croissance bactérienne est affectée par la concentration en métaux (MIC : Minimum Inhibition Concentration).

- Enfin, les métaux peuvent être biotransformés par des mécanismes d'oxydoréduction (ex Fe et Mn) liés à la respiration cellulaire, ou par alkylation (ex Hg). Ces transformations sont très importantes pour certaines bactéries (bactéries sulfato-réductrices en particulier) et ont une incidence sur la biodisponibilité, la mobilité et la toxicité du métal (dépendant de sa spéciation). Les métaux toxiques peuvent être également transformés en une forme moins toxique voire non toxique par oxydation ou réduction enzymatique. Pour leur métabolisme énergétique, de nombreux procaryotes peuvent utiliser les métaux présents sous différents états d'oxydation (Cr, Mn, Fe, Co, Cu, As ou Se) comme donneurs ou accepteurs d'électrons (Ledin, 2000).

Pour résumer, il existe dans la littérature un consensus concernant les flux clés qui définissent l'interaction de métaux traces avec les organismes aquatiques. Ces flux sont synthétisés dans la Figure I-7 (Worms et al., 2006). Les métaux et leurs complexes, doivent d'abord diffuser du milieu externe à la surface de l'organisme (transport de masse). Les complexes métalliques sont souvent dynamiques, capable de se dissocier et se réassocier (complexation/dissociation) avant d'atteindre la surface biologique. Pour avoir un effet, le métal doit, dans un premier temps, réagir avec un site sensible sur la membrane biologique (adsorption/désorption). Après adsorption, on observe souvent mais non nécessairement une phase d'internalisation. N'importe lequel des flux métalliques mis en jeu (par exemple diffusif; produit chimique de dissociation; internalisation...) peut être limitant pour l'ensemble du processus d'assimilation. L'ampleur de ces processus varie selon la nature chimique des composés, la taille, le type d'organisme et les conditions physicochimiques au voisinage de l'organisme (par exemple pH, concentrations de métal ou de ligand, potentiel membranaire). En outre, certaines réponses biologiques aux métaux (par exemple l'efflux, le changement de pH à l'interface biologique, les modifications de charge de surface...) influencent la physicochimie des métaux en solution et à l'interface et modifient ainsi le flux d'internalisation ou la concentration de métal bioaccumulée (Worms et al., 2006).



**Figure I-7 : Schématisation des principaux processus physicochimiques impliqués dans l'assimilation d'éléments traces métalliques (ETM) par les microorganismes (d'après Worms et al., 2006).** L correspond à un ligand capable de fixer le métal M,  $L_L$  correspond à un ligand lipophile,  $L_h$  correspond à un ligand hydrophile,  $L_{bio}$  correspond à un ligand biologique et  $M_{int}$  correspond au métal internalisé.

Etant donné la multitude d'interactions possibles entre les bactéries et les métaux, il apparaît nécessaire de mieux comprendre et de développer une méthodologie permettant de quantifier la part de ces différents mécanismes. En effet, de manière classique, on étudie la biosorption des métaux par les bactéries en s'intéressant à la capacité de biosorption globale des cellules bactériennes. L'étude de la distribution des métaux à l'échelle de la cellule pourrait apporter des renseignements sur l'importance de ces mécanismes. De plus, peu d'études ont pris en compte l'effet de l'état physiologique des cellules, alors que la mise en place de systèmes de résistance actifs peut fortement modifier la prise en charge des métaux par les bactéries (efflux, surproduction d'EPS, biolixiviation, biotransformation...).

## I-2-4. Les substances polymériques extracellulaires (EPS)

### I-2-4-1. Généralités

Les EPS sont des polymères produits par des microorganismes procaryotes et eucaryotes en milieu naturel ou artificiel. Non essentiel pour les cellules libres, dans les environnements naturels, les EPS jouent un rôle important dans l'adhésion cellulaire, la formation d'agrégats cellulaires (biofilms, sludges, biogranules) et protègent les cellules des agressions du milieu (Bhaskar et Bhosle, 2006; Kenney et Fein, 2011).

Les bactéries surproduisent en général des EPS en réponse à un stress environnemental. Depuis l'introduction du terme EPS, ce dernier a été variablement redéfini dans la littérature. Ainsi, en 1982, il caractérisait les substances d'origine biologique qui participent à la formation d'ensembles microbiens (Geesey, 1982). Lorsque que les chercheurs

se sont intéressés à la structure et fonctions des biofilms, les EPS ont été décrites comme "les polymères biologiques (organiques) d'origine microbienne qui, dans les biofilms sont fréquemment responsables de la cohésion des cellules et d'autres particules ensemble et au substrat (adhésion) (Characklis and Wilderer, 1989). Aujourd'hui, les scientifiques considèrent que les EPS sont les biopolymères résultant de différents processus microbiens comme la sécrétion active, la perte de matériel cellulaire, la lyse cellulaire et l'adsorption à l'environnement (Guibaud et al., 2005). Les EPS sont composées d'une grande variété de macromolécules de haut poids moléculaire tels que des polysaccharides (75 à 90 % de la masse), des protéines, des acides nucléiques et également des phospholipides et quelques molécules de faible poids moléculaire non-polymériques. Ces composés peuvent être présents à l'état pur ou en liaison avec différents groupes fonctionnels. Souvent les protéines sont associées avec des oligosaccharides pour former des glycoprotéines ou avec des oligoéléments pour former des lipoprotéines (Wingender, 1999). En général, les polymères qui se trouvent à l'extérieur de la paroi cellulaire et qui ne sont pas directement ancrés dans la membrane sont considérés comme des EPS. On distingue deux types d'EPS : les EPS liées et les EPS solubles. Les EPS solubles peuvent être extraites par centrifugation, tandis que les EPS liées exigent un traitement supplémentaire pour leur extraction. Les EPS solubles sont activement sécrétées par des bactéries et sont biodégradables, tandis que les EPS liées restent fixées à la biomasse active ou sont des molécules résultant de la lyse cellulaire (Guibaud, 2003; Guibaud et al., 2005; Comte et al. 2006a).

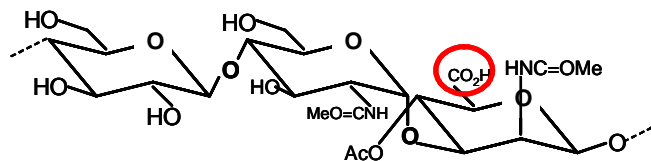
Les EPS présentent de très bonnes propriétés de rétention des métaux avec des variations de spécificité et d'affinité. La fixation de cations aux biopolymères bactériens se fait généralement par l'interaction électrostatique avec des groupes fonctionnels négativement chargés comme des acides uroniques, des groupes phosphoryles associés aux composants de membrane ou les groupes carboxyliques d'acides aminés. De plus, il peut aussi y avoir fixation de cations par des polymères positivement chargés par l'intermédiaire de groupements hydroxyles. Les EPS des microorganismes aquatiques agissent comme des polyanions dans des conditions naturelles par la formation de ponts salins avec les groupes carboxyles de polymères acides (polysaccharides contenant des acides uroniques) ou en formant des liaisons électrostatiques faibles avec des groupes hydroxyles sur des polymères contenant des glucides neutres. Tandis qu'un grand nombre de métaux sont connus pour se lier aux polysaccharides, la partie protéique des EPS joue aussi un rôle majeur dans la complexation d'ions métalliques. Les protéines riches en acides aminés acides (notamment l'acide glutamique et aspartique) contribuent aussi aux propriétés anioniques des EPS. Les acides nucléiques sont polyanioniques en raison de la présence des résidus de phosphate (

Figure I-8). Comme les composants négativement chargés des EPS, les acides uroniques, les acides aminés acides et les nucléotides contenant du phosphate sont suspectés d'être impliqués dans des liaisons électrostatiques avec les cations (Pal and Paul, 2008). Dans une récente étude, Kenney et Fein (2011) ont montré que les EPS présentent des groupements fonctionnels similaires à ceux que l'on retrouve à la surface des cellules bactériennes. A masse équivalente, les parois bactériennes et les EPS présentent des concentrations de sites réactifs et des affinités similaires vis-à-vis des protons et du Cd. Les auteurs proposent ainsi la

possibilité de modéliser la liaison des protons sur les biofilms par un jeu de constantes unique, comme c'est le cas pour les cellules bactériennes libres.

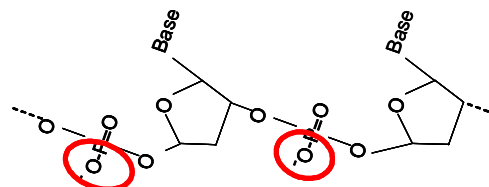
### **ExoPolySaccharides (EPS)**

- Seulement carboxyles



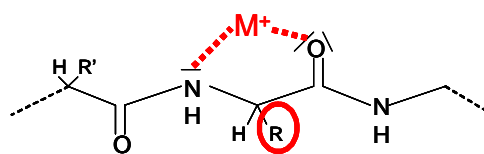
### **Acides nucléiques (DNA, RNA)**

- Sites phosphodiester  
- Bases fortes



### **Protéines**

- Amines,  
- Carboxyles,  
- Cysteines



**Figure I-8: Principaux constituants des substances polymériques exogènes (EPS) bactériennes et leurs sites de fixation potentiels des métaux.**

## **I-2-4-2. Les EPS et la bioremédiation**

Les EPS sont généralement acides et sont à la fois très réactives avec les métaux et très mobiles ; elles peuvent être assimilées à des ligands dissous et peuvent participer ainsi à la mobilisation des métaux. Ces EPS sont très réactives car très riches en groupements chargés négativement, comme le pyruvate, les phosphates, le succinate, les hydroxyles et les acides uroniques qui se lient fortement aux ions métalliques (Geesey, 1982; Chen et al., 1995). Chen et al. (1995) ont fait le bilan de la mobilisation des métaux par les polymères bactériens et ont montré que des polymères extracellulaires pouvaient être utilisés pour décontaminer efficacement les eaux souterraines et les sols pollués par des métaux. Le traitement de métaux lourds dans l'environnement par l'utilisation de biosorbants microbiens a été étudié le plus souvent dans un but de bioremédiation. Les EPS produites par de nombreux microorganismes sont d'un intérêt important dans les processus de bioremédiation par leur participation dans la floculation et l'adhésion des ions métalliques en solution. L'utilisation de biopolymères semble être l'alternative la plus économique, efficace et sûre comparée aux méthodes chimiques comme la précipitation, la coagulation, l'échange d'ion...

Les EPS d'origine bactérienne sont des transporteurs plausibles pour les métaux dans les sols ou les systèmes aquifères. Il a été montré que les bactéries pouvaient produire une large variété de polymères et certains auteurs ont évalué la fixation des métaux par ces polymères (Tableau I-3).

Tableau I-3: Capacité de biosorption des éléments traces métalliques (ETM) par les EPS bactériennes

Souche bactérienne	Métal sorbé	Quantité, mg.g <sup>-1</sup> EPS	Référence
Bactérie marine réductrice de sulfate	Mo(VI)	2.14	(Beech and Cheung, 1995)
	Ni(II)	0.43	
	Cr(III)	0.2	
<i>Methylobacterium organophilum</i>	Pb(II)	184.2	(Kim et al., 1996)
	Cu(II)	200.3	
<i>Alteromonas macleodii</i> subsp. <i>fijiensis</i>	Pb(II)	316	(Loaëc et al., 1997)
	Cd(II)	125	
	Zn(II)	75	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Cu <sup>I</sup>	Cu(II)	320	(Kazy et al., 2002)
<i>Enterobacter cloacae</i> AK-I-MB-71a	Cr(VI)	8.3	(Iyer et al., 2004)
<i>Chryseomonas luteola</i> TEM05	Cd(II)	64.1	(Ozdemir et al., 2005)
	Co(II)	55.2	
<i>Paenibacillus polymyxa</i> P13	Cu(II)	1602	(Prado Acosta et al., 2005)
	Pb(II)	228	
	Cd(II)	55	
<i>Paenibacillus jamilae</i> CECT 5266	Cu(II)	40	(Morillo Pérez et al., 2008)
	Zn(II)	37	
	Ni(II)	15	
	Co(II)	10	
<i>Pseudomonas putida</i>	Cd(II)	-	(Ueshima et al., 2008)
	Pb(II)	-	
Boues activées (consortium bactérien)	Cd(II)	-	(Guibaud, 2003; Comte, Guibaud, and Baudu, 2006a, 2006b)
	Cu(II)	-	
	Ni(II)	-	

### I-3. Métabolisme du Zn et du Cd chez les bactéries

Dans cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement aux interactions et à la prise en charge du Cd et du Zn par les bactéries. Afin de mieux comprendre la prise en charge de ces deux métaux, il est nécessaire de se renseigner sur le métabolisme du Cd et du Zn chez les bactéries. Ce paragraphe décrit les différents systèmes de transporteurs responsables de l'import et de l'efflux du Zn et du Cd chez les microorganismes.

#### I-3-1. Métabolisme du zinc chez les bactéries

Le plus souvent, le zinc se trouve sous forme d'un cation divalent (Zn<sup>2+</sup>) dans l'environnement. C'est un composant de nombreuses enzymes et de protéines liants l'ADN. L'assimilation du zinc, comme pour tous les ions essentiels, doit pouvoir se différencier de

celles des autres ions structurellement similaires, comme le Cd et le Pb (Silver and Phung, 2005). En général, les bactéries présentent deux systèmes d'importation du Zn. Un système qui présente une haute affinité pour le substrat et qui est couplé à une dépense énergétique, et un système non spécifique, contrôlé par le gradient chimiosmotique à travers la membrane (Blencowe and Morby, 2003). Le transport spécifique est assuré par différents types de protéines : les protéines de transport de type ABC, dont la plus connue est *ZnuABC*. Ces protéines sont généralement constituées de deux protéines transmembranaires formant un pore permettant le transport du substrat. Ce type de transport est hautement spécifique. Il existe également un transport rapide mais moins/non spécifique contrôlé par les systèmes de transport du Mg (montré chez *C. metallidurans*). Trois groupes de transporteurs sont impliqués dans ces systèmes : les transporteurs *CorA* MIT (Metal Inorganic Transport) (sans inhibition du transport de Mg), les transporteurs de la famille *MgtE* (sous influence du gradient chimiosmotique (moins fréquent que les protéines *CorA*), et les transporteurs de la famille *MgtA*, une ATPase de type P qui semble transporter le zinc plus efficacement que le Mg (Blencowe and Morby, 2003).

En ce qui concerne l'efflux du zinc, deux systèmes sont connus chez les bactéries : les protéines d'efflux P-type ATPases. Chez *E.coli* les P-type ATPases *ZntA*, *CadA* et *ZiaA* sont connus pour être responsables de l'efflux de zinc (Nies, 2003). Ces ATPases transportent le zinc uniquement à travers la membrane cytoplasmique. Les transporteurs de type RND (Resistance, Nodulation, cell Division) sont responsables du transport du zinc à travers la paroi cellulaire chez les bactéries à Gram négatif. Le premier système RND cloné fut le système de résistance au cobalt/zinc/cadmium (*Czc*) découvert chez *C. metallidurans*. Il a également été montré que des protéines de la famille CDF, telles que *ZntA* et *ZitB* peuvent participer à l'efflux du zinc (Blencowe and Morby, 2003; Nies, 2003). Ces différents mécanismes sont présentés sur la Figure I-9

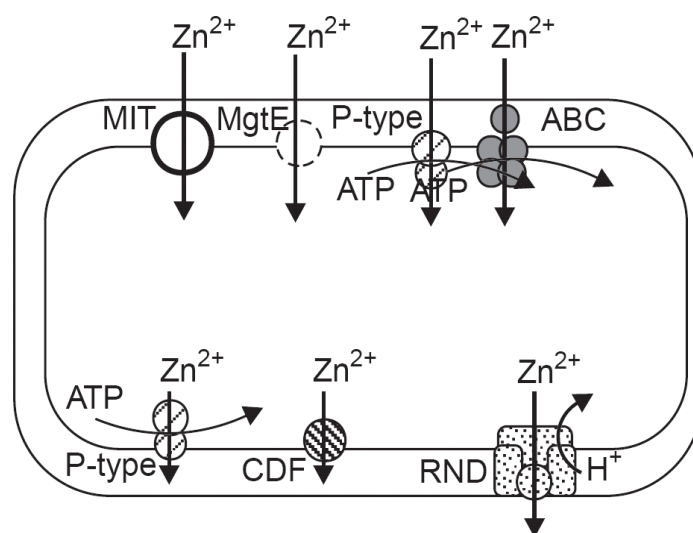


Figure I-9: Schéma représentant les principales familles de protéines impliquées dans le métabolisme du zinc chez les bactéries (Nies, 1999).

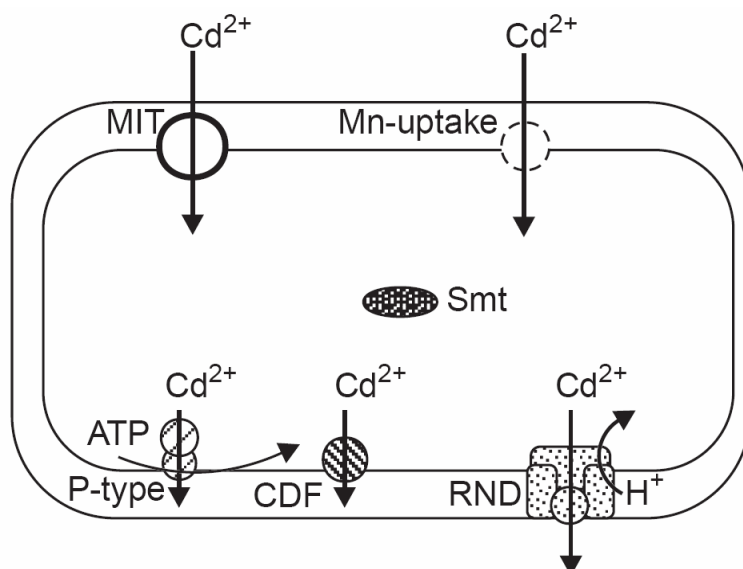
### I-3-2. Métabolisme du cadmium chez les bactéries

Dans l'environnement, le cadmium se trouve très souvent sous forme d'un cation divalent ( $\text{Cd}^{2+}$ ) et est plus toxique que le zinc. De nombreux auteurs ont tenté de comprendre

la toxicité du Cd vis-à-vis des microorganismes, mais aucun mécanisme précis n'a pu être mis en évidence. Les différents effets observés sont : la fixation du Cd aux groupements thiols qui entraîne la dénaturation de certaines protéines, l'interaction avec le métabolisme du calcium et la dégradation de la membrane et l'interaction avec le métabolisme du zinc.

En ce qui concerne l'assimilation du Cd, il semblerait que le Cd peut utiliser les systèmes de transporteurs du magnésium et du manganèse de type MIT. Dans leur étude Hao et al. 1999 ont identifié deux systèmes d'assimilation du Cd chez *L. plantarum* : un premier système de haute affinité et rapide d'import de manganèse qui peut aussi transporter le Cd. Ce système a été découvert en montrant un effet de compétition entre Mn et Cd. D'autres auteurs ont également montré que le Cd peut rentrer dans la cellule via des systèmes de transport du Ca, du Mg, du Mn et du Zn (Laddaga and Silver, 1985; Smiejan et al., 2003; Slaveykova et al., 2009).

La résistance au Cd est principalement basée sur des systèmes d'efflux (Silver and Phung, 2005). Chez les bactéries à Gram négatif le Cd semble être détoxifié par des systèmes P-type ATPase comme l'ATPase CadA découverte chez *S. aureus* (Silver and Phung, 2005), ou bien par le complexe *czc* découvert chez *C. metallidurans*, qui est principalement un transporteur de Zn, et le complexe *ncc*, un transporteur de Ni (Bruins et al., 2000; Nies, 2003). Chez *S. cerevisiae* le Cd peut se lier à du glutathion et le complexe résultant est ensuite transporté par un transporteur spécifique (ABC famille) vers la vacuole. Ces différents mécanismes sont résumés dans la Figure I-10. Pagès et al. (2007) ont montré que 2 mutants de *Pseudomonas* présentaient 2 modes différents de résistance au Cd. Un premier mécanisme de sélection de transporteurs est caractérisé par une diminution de la régulation des transporteurs du Cu et du Cd couplée à une augmentation des protéines *CadA* responsables de l'efflux du Cd. Le second mutant n'est pas capable d'empêcher l'entrée de Cd dans la cellule (ce qui induit un stress oxydant) et se protège du Cd en maintenant un pool intracellulaire de putrescine et en augmentant la spermidine afin d'inertiser le Cd au niveau intracellulaire. Roane et al. (2001) ont montré que deux bactéries résistantes au Cd présentaient un mécanisme de séquestration intracellulaire. Ce mécanisme est lié à des gènes codant pour des plasmides de résistance. Bien que les mécanismes précis d'accumulation intracellulaire ne soient pas élucidés, il semblerait que la production de métallothionéines et la précipitation avec du phosphate soient deux explications probables.



**Figure I-10:**Schématisation des principales familles de protéines impliquées dans le métabolisme du cadmium chez les bactéries (Nies, 1999).

## I-4. Transfert facilité de métaux par les bactéries

### I-4-1. Interactions de surface et théorie DLVO

Afin d'étudier le transport de colloïdes en milieu poreux, il est nécessaire d'étudier les relations qui peuvent exister entre les colloïdes eux mêmes mais également entre un colloïde et la surface des constituants d'un milieu poreux. Les principales interactions mises en jeu sont celles de Van der Waals, les interactions électrostatiques et les interactions stériques à longue distance. Les interactions colloïde/colloïde et colloïde/matrice peuvent être exprimées en termes de potentiel énergétique d'attraction, conduisant à un dépôt des colloïdes, ou de répulsion conduisant au transport des colloïdes (Figure I-11). Ce potentiel est fonction de la distance séparant la cellule de la matrice poreuse et de l'équilibre entre les forces attractives et répulsives (Rijnaarts, 1995). Les forces de van der Waals et les interactions hydrophobes sont considérées comme attractives alors que les interactions électrostatiques peuvent être répulsives (Rijnaarts, 1995; Hermansson, 1999; Otto et al., 1999). La théorie DLVO (du nom de ses auteurs : Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek) permet de décrire la stabilité d'une suspension colloïdale qui est déterminée par les forces de van der Waals attractives qui provoquent l'aggrégation des particules colloïdales et par des forces électrostatiques répulsives qui conduisent au contraire, à leur dispersion (Rijnaarts, 1995; Hermansson, 1999).

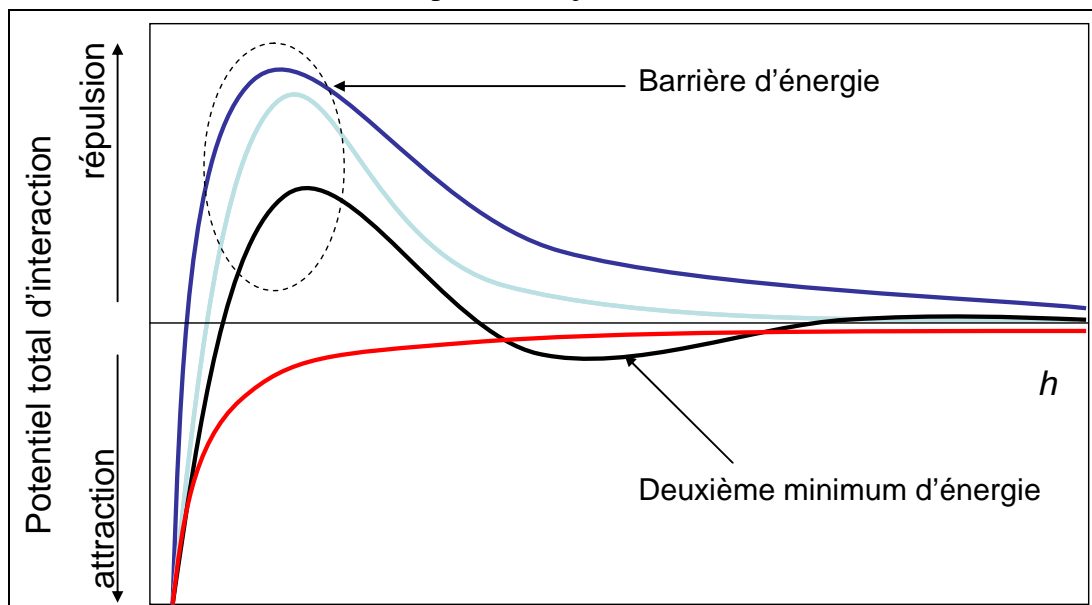


Figure I-11: Profils de potentiel énergétique total d'interaction grain/colloïde d'après la théorie DLVO (Vitorge, 2010).

La combinaison de ces deux profils de potentiel énergétique induit la domination des forces de van der Waals aux courtes et longues distances; ainsi la courbe d'énergie d'interaction présente deux régions à dominante attractive encadrant une région à dominante répulsive. Les régions attractives définissent un minimum primaire aux courtes distances et un minimum secondaire aux longues distances tandis que la région répulsive définit une barrière d'énergie. Une fois la barrière d'énergie franchie, il y a coagulation des particules (dans le minimum primaire); il peut aussi y avoir coagulation dans le minimum secondaire, mais de moindre énergie et donc de plus faible stabilité (généralement réversible). La théorie DLVO permet d'expliquer en partie la mobilisation et le dépôt des colloïdes en considérant les interactions de grande échelle (distances de séparation supérieures à 2 nm). Cependant, les interactions attractives dues à l'hydrophobie des cellules et les interactions répulsives



stériques ou d'hydratation, peuvent également contribuer au dépôt des colloïdes dans les milieux poreux et sont quelques fois prises en compte par des théories dites « non-DLVO » ou « DLVO étendue » (Rijnaarts, 1995; Hermansson, 1999).

La somme des interactions de van der Waals et des interactions électrostatiques dépend de la taille des particules, de la charge de surface (estimée par le potentiel zêta), de la force ionique et de la valence des ions de la solution. Selon ces paramètres on peut observer ou non une barrière de potentiel signifiant un potentiel répulsif. De manière expérimentale, il est possible de caractériser certaines propriétés de surface des colloïdes tels que les groupements fonctionnels, l'hydrophobie et la charge de surface (potentiel zêta). Ces propriétés permettent de mieux caractériser les interactions colloïde - colloïde et colloïde - milieu. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe I-2-2, la surface des bactéries est complexe et constituée de différents groupements fonctionnels (phospholipides, lipopolysaccharides et lipoprotéines) qui influencent la réactivité globale des bactéries avec leur milieu environnant. Ces groupements fonctionnels vont principalement jouer sur l'hydrophobie et le potentiel zêta des cellules qui jouent un rôle prépondérant dans les interactions des bio-colloïdes.

## **I-4-2. Transfert et rétention des colloïdes en milieu poreux**

### **I-4-2-1. Mobilisation des colloïdes**

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons vu les différentes interactions possibles entre les métaux et les bactéries à l'échelle de la cellule. Afin de mettre en évidence le rôle des colloïdes bactériens dans le transport des polluants métalliques il est nécessaire de considérer les mécanismes de mobilisation et de transport des colloïdes eux-mêmes dans les milieux poreux. Cette quatrième partie du chapitre I portera donc sur la mobilité des colloïdes en milieux poreux. Nous nous intéresserons ici principalement aux mécanismes qui contrôlent la rétention et la mobilisation des colloïdes dans les sols. Les particularités propres aux biocolloïdes seront décrites plus tard dans ce chapitre. Au cours de leur transport dans les milieux poreux, les colloïdes sont soumis à différents mécanismes comme la diffusion, la convection, la dispersion, la sédimentation et à des mécanismes de rétention. Le déplacement par convection se fait dans le sens des lignes de courant du fluide. A l'échelle macroscopique, l'écoulement est généralement décrit par la loi de Darcy. Au sein du fluide, les colloïdes peuvent également être soumis à de la diffusion favorisée par les mouvements browniens. Le phénomène de dispersion hydrodynamique désigne la dispersion mécanique et la diffusion moléculaire (coefficient  $D$  en  $\text{cm}^2.\text{h}^{-1}$ ). La dispersion mécanique, créée par la convection, est affectée par la distribution des vitesses au sein d'un pore, la distribution de taille des pores et la tortuosité du milieu. L'équilibre entre le transport et le dépôt des particules peut être affecté par des modifications des conditions hydrodynamiques et physicochimiques qui peuvent modifier les profils énergétiques d'interaction colloïdes-milieu. Dans le cas d'un régime stationnaire, lorsque les forces hydrodynamiques et colloïdales ne varient pas, il n'y a pas de (re-)mobilisation possible des particules déposées et inversement les particules mobilisées ne peuvent pas se (re-)déposer (Nocito-gobel and Tobiason, 1996). Des modifications physicochimiques telles que l'augmentation du pH ou la diminution de la force ionique du système vont avoir tendance à favoriser la (re-)mobilisation des particules (Ryan and Elimelech, 1996; Roy and Dzombak, 1997; Kretzschmar et al., 1999). Le processus de mobilisation des colloïdes dépend donc de l'altération de l'équilibre des forces entre les colloïdes et les surfaces avec lesquelles ils interagissent. Pour avoir un effet sur la mobilité, il est donc nécessaire que les forces de répulsion deviennent dominantes entraînant alors la

mobilisation des colloïdes (théorie DLVO). Cette altération peut être due à des modifications physiques ou chimiques, ces dernières étant considérées comme les principales sources de mobilisation des colloïdes notamment via des variations de force ionique (Kretzschmar et Schäfer 2005; Guiné et al. 2003, Sen et Khilar 2006; Sen, Mahajan, et Khilar 2002). Des facteurs physiques peuvent également entraîner une mobilisation des particules. Par exemple, lorsque la porosité et la vitesse d'écoulement sont importantes, des particules colloïdales peuvent être détachées par des forces hydrodynamiques (cisaillement) et transportées à travers le milieu poreux (Bergendahl and Grasso, 2003). Dans les sols, les conditions favorables à la libération de particules sont réunies par exemple lors de fortes pluies durant lesquelles un grand volume d'eau de faible force ionique s'infiltre dans le sol. De plus, lors de fortes précipitations, l'écoulement rapide de l'eau peut entraîner un arrachement mécanique des particules colloïdales (Kretzschmar and Sticher, 1998).

#### I-4-2-2. Dépôts des colloïdes

Les mécanismes de transport de particules colloïdales dépendent avant tout des conditions hydrodynamiques qui peuvent être affectées par des mécanismes de sédimentation, d'interception, d'attraction et de diffusion brownienne entraînant alors un dépôt des colloïdes comme indiqué sur la Figure I-12. Ces mécanismes dépendent beaucoup de conditions comme la taille et la densité des colloïdes, la structure du milieu poreux et la vitesse du fluide (Ryan and Elimelech, 1996).

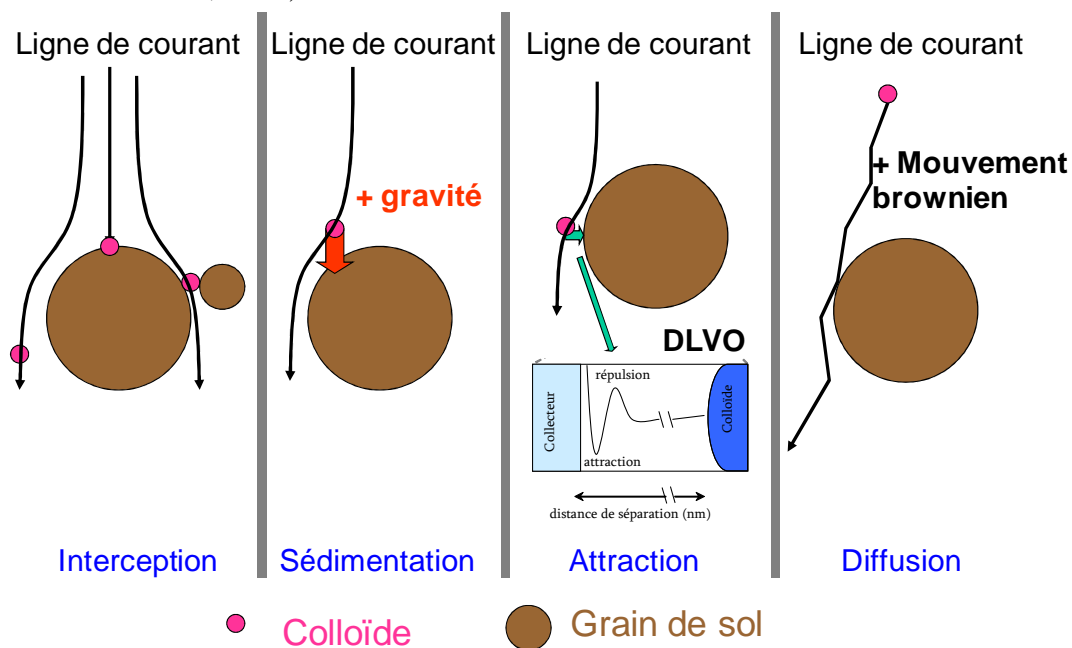


Figure I-12: Mécanismes de dépôts de colloïdes sur un collecteur (d'après Rijnaarts, 1995 et Vitorge 2010).

Les colloïdes transportés n'entrent pas nécessairement en contact avec la matrice, mais si ce contact a lieu, il peut y avoir adhésion lorsque les conditions sont favorables. Par ailleurs une particule attachée ne l'est pas forcément de façon irréversible et donc peut être relarguée si les conditions s'y prêtent. Le dépôt des colloïdes correspond au rapprochement suivi de l'attachement des colloïdes (essentiellement par les interactions de van der Waals) à la matrice solide stationnaire. Dans les sols, ce processus est favorisé lorsque les surfaces colloïdales sont chargées positivement car la matrice du sol a généralement une charge nette négative. A l'inverse, lorsque les particules colloïdales portent une charge négative, les

interactions avec les constituants du sol sont limitées. Ainsi, la chimie de la solution et des interfaces joue un rôle essentiel dans le dépôt des particules (franchissement de la barrière énergétique de répulsion) mais il ne faut pas omettre les autres facteurs tels que la dimension des particules, des micropores et la vitesse du fluide qui peuvent favoriser des processus de sédimentation ou de filtration (Ryan and Elimelech, 1996). En effet, les particules colloïdales peuvent être mécaniquement piégées (filtrées) à l'entrée de micropores, lorsque la taille des particules est supérieure à la taille des pores, ce qui a pour conséquence la diminution des débits et du transport par colmatage du milieu poreux (Sen and Khilar, 2006), on parle alors de « straining ». Ce mécanisme correspond au piégeage des colloïdes dans les pores trop étroits pour permettre leur passage (Foppen et al., 2005, 2007; Auset and Keller, 2006). On considère généralement que la rétention par straining a généralement lieu dans les pores les plus proches du point d'injection lorsque le rapport taille des colloïdes ( $d_p$ ) sur taille des grains ( $d_{50}$ ) est supérieur à 0.05 (Redman et al., 2004). Toutefois Bradford et al. (2003) ont montré que même pour des valeurs inférieures, les phénomènes de straining sont possibles, notamment à cause de l'hétérogénéité des grains. Ces auteurs considèrent que le straining devient significatif lorsque  $d_p/d_{50} > 0.005$ , lorsque l'on considère des grains et des colloïdes de forme quasi sphérique.

### **I-4-3. Effet des facteurs physico-chimiques sur le transport de colloïdes**

#### **I-4-3-1. Force ionique et valence des ions**

D'après la théorie DLVO, la force ionique et la valence des ions en solution contrôlent les forces répulsives alors qu'elles n'impactent pas les forces attractives de van der Waals (Elimelech and O'Melia, 1990). Elles déterminent la position et le niveau de la barrière énergétique ainsi que la profondeur du second minimum énergétique des profils d'énergie d'interaction. Une force ionique faible augmente la barrière d'énergie et favorise ainsi la répulsion et donc la mobilité. Au contraire une force ionique élevée réduit la répulsion électrostatique et favorise le dépôt des colloïdes. De nombreuses études en colonnes de laboratoire ou *in situ* ont montré que la variation de la force ionique joue un rôle essentiel dans la mobilisation/immobilisation des colloïdes (Nocito-gobel and Tobiason, 1996; Roy and Dzombak, 1997; Camesano and Logan, 1998; Camesano, 1999; Kretzschmar et al., 1999; Redman et al., 2004; Guiné, 2006). Plus la force ionique est faible, plus le taux de restitution des particules augmente (Nocito-gobel et Tobiason 1996; V. Guiné et al. 2003; Redman, S. L. Walker, et Elimelech 2004; Camesano 1999; Camesano et Logan 1998). Toutefois, la force ionique seule n'explique pas tout, la valence des ions joue également un rôle important. Il a été montré que les ions monovalents ( $\text{Na}^+$ ) induisent une mobilisation supérieure des colloïdes, en particulier pour les bactéries, que les ions divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ) pour une force ionique donnée (Roy and Dzombak, 1997; Saiers and Hornberger, 1999, Guiné et al. 2003, 2006). Les cations divalents neutralisent plus efficacement la charge des particules et par conséquent provoquent plus facilement leur floculation/agrégation que les cations monovalents, favorisant ainsi le dépôt des colloïdes (Grolimund et al., 1998; Kim et al., 2009).

#### **I-4-3-2. Effet du pH de la solution du sol**

Dans les milieux naturels où le pH est compris entre 4 et 8 les interactions entre la matrice poreuse et les colloïdes sont généralement répulsives. Le pH joue un rôle sur les

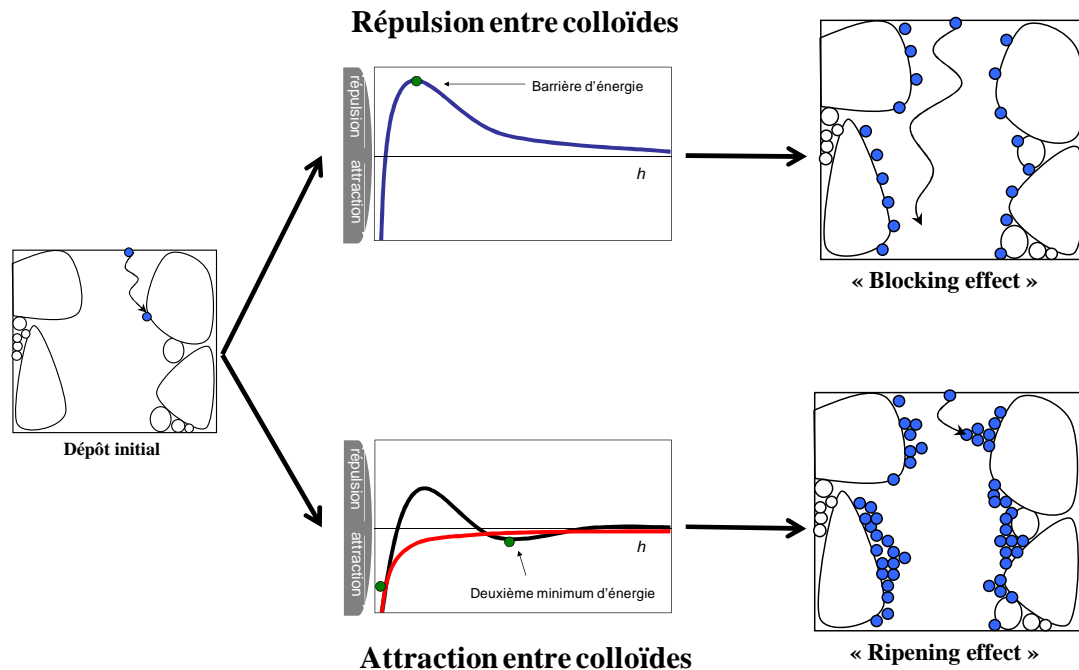
charges de surface des colloïdes et de la matrice contrôlant ainsi la répulsion électrostatique. L'augmentation du pH entraîne généralement une augmentation des phénomènes répulsifs du fait du changement de charge des surfaces minérales et organiques. A pH élevé, la répulsion augmente et il y a moins de dépôt des colloïdes dans les milieux poreux (Ryan and Elimelech, 1996). Des études ont montré que la mobilisation des particules minérales dans la plupart des sols est favorisée par un pH important et une force ionique faible (Saier and Hornberger, 1999; Grolimund et al., 2001). Au contraire, aux faibles pH, les surfaces solides sont protonées et donc moins électro-négativement chargées, et plus propices à la rétention des colloïdes.

#### **I-4-3-3. Effet de la taille et de la concentration en colloïdes**

L'influence de la taille des colloïdes sur leur transfert est intimement liée à la structure du milieu poreux (taille des micropores et de l'interconnectivité). Plus la distribution de taille des particules et celle des pores se chevauchent, plus le colmatage des pores de petite taille est important et dépendant de la concentration en colloïdes (Sen and Khilar, 2006). En conditions statiques, la mobilité colloïdale en milieu poreux est essentiellement contrôlée par la diffusion résultant du mouvement brownien. En conditions dynamiques, ce sont au contraire les mécanismes de convection et de dispersion qui contrôlent cette mobilité. (Song et al., 1994; ou Ryan and Elimelech, 1996) ont montré que le taux de rétention des colloïdes augmentait avec la diminution de leur taille. Plus leur surface spécifique est grande et plus la probabilité de collision et la capacité de rétention des colloïdes sont élevées. Au contraire, Cumbie and McKay (1999) ont montré que l'augmentation de la taille des colloïdes s'accompagne simultanément d'une augmentation des processus de filtration et de sédimentation limitant ainsi la mobilité colloïdale. L'effet de la taille des colloïdes sur leur transport n'est donc pas clairement établi et nécessite de nouvelles études.

Une concentration en particules colloïdales élevée induit un effet majeur sur le transfert des colloïdes lorsque les conditions de transfert sont chimiquement ou mécaniquement limitées. Kretzchmar et al. (1999) ont montré que pour de faibles concentrations, la migration des colloïdes minéraux est retardée par rapport aux fortes concentrations, suggérant une plus forte rétention de ces colloïdes sur la matrice poreuse, à ces faibles concentrations. Cependant, les effets de rétention dus à la concentration en colloïdes dépendent surtout des interactions colloïde/matrice et colloïde/colloïde, comme l'illustre la Figure I-13. On distingue alors deux cas de figure, lorsque les interactions colloïde/colloïde ne sont pas favorisées, le taux de déposition diminue lorsque la concentration en particules augmente, ce phénomène est appelé « **blocking effect** » (Camesano, 1999; Haznedaroglu et al., 2009). Dans ce cas, les sites de fixation de la matrice sont saturés par les premiers colloïdes, les suivants étant repoussés par les premiers ne se fixeront pas à la matrice et seront transportés plus facilement.

Inversement, si les interactions entre colloïdes sont favorisées, le dépôt des particules augmente avec la concentration; on parle alors du phénomène de « **ripening effect** » (Camesano, 1999; Haznedaroglu et al., 2009). Dans ce cas, la fixation des premiers colloïdes à la matrice entraîne une augmentation des sites de fixations potentiels et donc une augmentation du dépôt. Ces mécanismes sont présentés sur la Figure I-13.



**Figure I-13: Interactions colloïdes – matrice, colloïdes - colloïdes et illustration des phénomènes de « blocking effect » et de « ripening effect » (d'après Camesano, 1999).**

A ces phénomènes, dus aux interactions entre colloïdes, peuvent s'ajouter des effets géométriques. Lorsque le rapport entre la taille des particules et celle des pores est petit, la concentration colloïdale joue un rôle d'autant plus important. La concentration colloïdale contrôle en partie le phénomène de colmatage des milieux poreux sous forme d'un effet de seuil : le colmatage devient effectif lorsque une Concentration Critique en Colloïdes (CCC) est dépassée (Sposito 1989, Roy and Dzombak, 1997; Sen and Khilar, 2006). L'étude de l'effet de la concentration cellulaire sur le transport des biocolloïdes s'avère indispensable dans un contexte de bioremédiation. En effet, dans les milieux naturels, les bactéries peuvent se multiplier, si les conditions sont favorables, ce qui peut alors modifier leur comportement et par conséquent leur impact sur la mobilité des polluants.

#### **I-4-3-4. Effet de la vitesse d'écoulement dans le milieu poreux**

La vitesse d'écoulement dans le milieu poreux a également été décrite comme un facteur pouvant contrôler la mobilité des colloïdes notamment par un effet mécanique d'arrachement. L'augmentation de la vitesse d'écoulement modifie la distribution des vitesses dans les pores (écoulement plus rapide au centre des pores). Cela induit une diminution du temps de contact colloïde/matrice ainsi que la probabilité de collision entre les colloïdes et les grains de la matrice. Le transport colloïdal est alors augmenté. Ainsi, à fort débit il y a peu de rétention et à l'inverse à faible vitesse porale, les particules sont plus fortement retenues ou retardées (Sen and Khilar, 2006). De plus, une augmentation de la vitesse du fluide peut provoquer la remise en suspension de colloïdes par arrachement (Ryan and Elimelech, 1996).

#### **I-4-3-5. Effet de la géométrie du milieu**

Certaines études ont montré que la géométrie de la porosité des sols pouvait jouer un rôle important dans la rétention des colloïdes, en particulier les hétérogénéités de surface des grains de la matrice ou leur taille (Truesdail et al., 1998; Ginn et al., 2002; Li et al., 2004;

Gargiulo et al., 2007). Ces hétérogénéités peuvent créer des régions favorables à l'attachement des colloïdes, dans lesquelles ils peuvent se déposer dans le premier ou second minimum d'énergie. Ceci semble particulièrement important pour la rétention des cellules bactériennes qui présentent une taille relativement importante pour des colloïdes (jusqu'à plusieurs microns). Ainsi, au sein du milieu poreux il existe des zones où l'eau peut être piégée et immobile et donc où les flux d'eau sont nuls. C'est dans ces zones que les bactéries peuvent alors diffuser et se retrouver piégées en plus des zones de constriction où les pores sont trop petits pour permettre le passage des cellules (Truesdail et al., 1998; Jacobs, 2007; Johnson, Li, et al., 2007). Jacobs et al. (2007) ou plus récemment Vitorge (2010) ont montré par imagerie que les bactéries ou les nanoparticules peuvent être piégées au niveau de « cavités » ou de « canaux » présents à la surface des grains de sable.

#### **I-4-4. Particularité du transport des biocolloïdes**

Du fait de leur activité biologique, les biocolloïdes présentent des mécanismes de transport plus complexe que les colloïdes abiotiques. Ils sont sujets aux mêmes mécanismes physicochimiques que les colloïdes inorganiques (Sen et al., 2005) mais sont également affectés par des mécanismes purement biologiques comme le métabolisme, le cycle cellulaire ou la motilité. De plus, la diversité des microorganismes, et donc de leurs propriétés de surface (charge de surface, hydrophobie, taille, forme...) rend leur étude plus complexe, notamment si l'on cherche à généraliser les processus mis en jeu. Comme pour les colloïdes inorganiques, les propriétés physicochimiques des milieux poreux contrôlent largement les processus de mobilisation/immobilisation des biocolloïdes. L'attachement des microorganismes aux milieux poreux est également gouverné par des interactions électrostatiques de surface. Les conditions de mobilisation ou de déposition sont sujettes aux mêmes variations physiques et chimiques telles que celles de la vitesse d'écoulement, la teneur en eau, la force ionique et le pH de la solution, etc. De ce point de vue, le transport biocolloïdal est proche du transport colloïdal. Cependant, le transport bactérien dans les sols est globalement plus complexe du fait que les colloïdes bactériens sont physiologiquement actifs et subissent un certain nombre de processus strictement biologiques qui affectent leur transport (Sen et al., 2005; Oliver et al., 2007).

La concentration en cellules et en nutriments, les relations de compétition entre les populations bactériennes, les mécanismes de croissance et d'inactivation, les besoins métaboliques ont été identifiés pour leurs effets sur le devenir des bactéries et leur transport dans les milieux poreux (Guiné et al. 2003, Sen et al., 2005). De plus, comparées aux colloïdes abiotiques, les bactéries sont plus susceptibles d'être confrontées aux processus de filtration et de straining. Des effets d'exclusion de taille peuvent être observés avec les bactéries, ce qui implique un transport plus rapide que le fluide en raison de la taille ou de la charge des colloïdes transportés. Des processus électrostatiques ou chimiques, tel que l'adsorption sur la matrice ou la désorption, peuvent affecter fortement le transport des bactéries (Foppen et al. 2007). Les processus biologiques mis en jeu impliquent également des phénomènes d'adhésion/détachement actifs à la matrice, de croissance cellulaire, de motilité et de chimiotactisme.

On considère que la rétention des biocolloïdes, dans les milieux poreux, est alors contrôlée par 3 mécanismes majeurs :

- **La filtration mécanique** qui a lieu quand les particules en suspension sont trop larges pour traverser les pores. Ce mécanisme peut entraîner un colmatage des pores, ce qui peut conduire à la diminution du flux d'eau.

- **Le straining**, qui correspond au piégeage des particules colloïdales dans les pores trop étroits pour permettre leur passage (Auset et Keller 2006; Foppen et al. 2007; Foppen et al. 2005). La rétention de particules par straining a généralement lieu dans les pores les plus proches du lieu d'injection et dépend de critères géométriques comme le rapport taille des pores / taille des colloïdes.

- **L'attachement** (ou filtration physicochimique). Il est désormais communément admis que le transport de biocolloïdes dépend fortement de leur capacité de rétention sur les particules du milieu, contrôlée par les groupements fonctionnels de surface, et de leur capacité de survie (Oliver et al., 2006; Pachepsky et al., 2006; Soupir et Mostaghimi, 2010).

Les bactéries peuvent s'adsorber sur différents matériaux géologiques. Les forces contrôlant l'adsorption sont les interactions entre les particules et les interfaces de la matrice telles que la dispersion et les interactions électrostatiques. L'attachement et l'adsorption des bactéries à une surface se fait en deux étapes. Tout d'abord intervient une adsorption réversible de faible interaction entre les bactéries et le collecteur (dans le second minimum d'énergie). Dans cette situation, les cellules peuvent être détachées et suivre le flux d'eau. La seconde étape est l'adsorption irréversible, ou adhésion, qui correspond à l'adsorption sur la matrice qui reste permanente tant qu'il n'y a pas de changement des conditions physicochimiques de la solution percolante. Comme pour les colloïdes abiotiques, l'adsorption des bactéries dépend de facteurs physiques (nature du milieu, présence de MO, température, vitesse du flux d'eau...), chimiques (chimie de la solution) et microbiologiques (hydrophobe, charge de surface...) (Stevik et al., 2004).

Nous ne reviendrons pas sur les propriétés physicochimiques influant sur le transport des biocolloïdes qui sont les mêmes que pour les colloïdes inorganiques. Concernant les facteurs biologiques on distingue les mécanismes d'adhésion et de détachement actifs à la matrice. Des études ont montré que ces phénomènes étaient une réponse à la présence de nutriments dans certaines zones du milieu créant ainsi des niches favorables à la présence de bactéries (Stevik et al., 2004). Ces mécanismes sont régis par la nécessité de survie et de croissance des cellules qui peuvent alors se déplacer volontairement dans le milieu à la recherche de zones plus favorables à la croissance cellulaire. Plusieurs paramètres tels que l'humidité, la température, la salinité, le pH, la prédation, l'oxygène dissous sont importants pour le métabolisme bactérien et sont donc à prendre en compte. Les charges électrostatiques présentes à la surface des cellules et hydrophobicité influencent également l'adhésion des bactéries aux surfaces par le contrôle des potentiels énergétiques. Le chimiotactisme, qui est décrit comme le mouvement des organismes selon un gradient chimique (attraction ou répulsion), peut induire le mouvement des cellules bactériennes par des mécanismes actifs puisque le chimiotactisme nécessite de l'énergie et est donc intimement lié au métabolisme bactérien (mobilisation de flagelles ou de pilis. Enfin la motilité de certaines espèces peut également fortement influencer leur transport (Camesano and Logan, 1998).

## **I-5. Etude du transfert de polluants associés aux colloïdes**

### **I-5-1. Mise en évidence du transport de polluants facilité par les colloïdes**

En dépit de leur faible proportion en masse dans les sols, les particules colloïdales peuvent participer à l'augmentation de la solubilité apparente des polluants. Si les contaminants s'adsorbent fortement sur des colloïdes mobiles, alors ces polluants peuvent être transportés rapidement et à de longues distances de leur source. Ce mécanisme est connu sous

le nom de transport facilité des polluants par les colloïdes (McCarthy and Zachara, 1989; Guiné et al. 2003, Kretzschmar and Schäfer, 2005). Des études récentes montrent qu'il ne s'agit pas seulement d'une « facilitation » du transport mais davantage d'une « association » entre les polluants et les colloïdes. Cette notion de transport associé est donc préférée. En effet, elle ne concerne pas uniquement l'accélération du transport des contaminants par les colloïdes mais elle prend également en considération le retard induit par la présence des particules colloïdales immobilisées (Bekhit et al., 2009), ou encore le biolessivage des métaux par la production de ligands organiques capables de les chélater puis de les mobiliser (Lloyd et al., 2003; Gadd, 2009; Gilmour et Riedel, 2009; Jerez, 2009; Uroz et al., 2009)

La plupart des observations du transport facilité des contaminants par les colloïdes sont basées sur des observations de terrain (indirectes), des calculs ou des expériences de laboratoire en colonnes. Plusieurs revues de littérature concernant les mécanismes de facilitation du transport des contaminants liés à la présence de particules colloïdales sont disponibles (e.g. McCarthy et Zachara 1989; Mills et al. 1991; Ryan et Elimelech 1996; Kretzschmar et al. 1999; Sen et Khilar 2006). Le transport facilité de polluants par les colloïdes (inorganiques ou organiques) a été montré en premier pour des radionucléides, puis pour des cations alcalins, des métaux, des oxyanions et des composés organiques polaires ou apolaires. Ces études ont montré que les colloïdes adsorbent les métaux lourds et autres polluants et gouvernent ainsi, par leur propre mobilité dans les milieux poreux, le devenir de ces polluants. Ils peuvent même s'avérer être le principal mode de transport des polluants dans les sols mais surtout dans les rivières ou à l'échelle du bassin versant (McCarthy et Zachara, 1989; Pédrot et al., 2008; Yin et al., 2010). Citeau et al. (2003) ont montré que les colloïdes naturels sont impliqués dans la mobilisation de métaux et que l'importance de ce mécanisme dépend du métal considéré. Par exemple, le plomb est transporté principalement sous forme colloïdale, indiquant de fortes interactions entre le Pb et les colloïdes. Le Zn et le Cd sont plutôt transportés sous forme dissoute, les colloïdes semblent moins impliqués dans leur transport dans les sols testés. Toutefois, Karathanasis, et al (2005) ont montré que la présence de colloïdes pouvait augmenter la vitesse de transport du Cu et du Zn de 5 à 50 fois et celle du Pb de 10 à 3000 fois. Pang et al. (2005) ont montré une accélération du transport de Cd de 5 à 28 fois en présence de bactéries. De plus, la mobilisation colloïdale semble être une forme de transport prédominante pour les contaminants fortement adsorbables sur les matrices solides, comme certains métaux (Pb, Cs, etc.) ou composés organiques hydrophobes. De même, Citeau et al. (2003) ont montré que les conditions physicochimiques induites spécifiquement par le type de sol et son utilisation contrôlent la nature des colloïdes circulant dans les eaux gravitaires et par conséquent leur rôle sur le transport d'ions métalliques tels que le plomb, le zinc ou le cadmium. Le rôle de la fraction colloïdale s'est avéré significatif par exemple, pour l'ion  $Pb^{2+}$  alors que pour des ions comme  $Zn^{2+}$  et  $Cd^{2+}$ , les formes dissoutes ou complexées sont majoritaires. Grolimund et al. (1998) ont également montré par lessivage d'une colonne de sol contaminée au plomb, qu'en présence d'une faible force ionique il existe une migration importante du plomb sous forme colloïdale. D'ailleurs, en étudiant les eaux collectées dans un sol contaminé, Denaix et al. (2001) ont montré qu'environ 50 % du plomb était sous forme colloïdale dans l'horizon de surface alors que le zinc et le cadmium étaient à 95 % sous forme soluble. D'autres études en colonnes de laboratoire ont montré que les métaux plus mobiles tels que le zinc, le cadmium, le cuivre ou le nickel pouvaient bénéficier d'un transport facilité par des colloïdes inorganiques (Karathanasis, 1995; Keller et Domergue, 1996; Sen et al., 2002; Karathanasis et al., 2005). Par conséquent, le transport colloïdal des métaux qu'ils soient réputés immobiles (Pb, Cs, ...) ou non (Zn, Cd, Cu, ...), est un processus important que l'on ne peut pas négliger lorsque l'on étudie leur dynamique dans les milieux naturels.



Le rôle potentiel des colloïdes dans le transfert facilité des métaux a été discuté dès 1989 par McCarthy and Zachara. Toutefois, assez peu d'études de laboratoire ou de terrain ont concerné les biocolloïdes, qui de part leur propriétés de surface, sont sujets aux mêmes processus physicochimiques que les colloïdes abiotiques, mais qui subissent en plus des processus strictement biologiques qui peuvent affecter leur réactivité, leur mobilité et par conséquent le transfert associé à des polluants (Guiné et al. 2003, Sen *et al.*, 2004; Sen *et al.*, 2005; Foppen and Schijven, 2006). Les cellules bactériennes peuvent être considérées comme des colloïdes importants dans les sols (jusqu'à plusieurs milliards de cellules par gramme de sol) et qui peuvent affecter le transport de métaux lourds. Leurs surfaces sont généralement négativement chargées et comportent de nombreux groupements fonctionnels susceptibles de fixer les métaux cationiques. Une étude a montré que les cellules de *E. coli* semblent augmenter la solubilité du Cd alors que les cellules de *B. subtilis* semblent le co-transporter (Pang et al., 2005). Chen et al. (1995) ont fait le bilan de la mobilisation des métaux par les polymères bactériens et ont montré que des polymères extracellulaires pouvaient être utilisés pour décontaminer efficacement les eaux souterraines et les sols pollués par des métaux. Guiné et al. (2003, 2006) ont montré que le transport du Cd et du Zn pouvait être accéléré par la présence de bactéries. De même, Yee and Fein (2002) ont montré que sous certaines conditions de pH et de minéralogie, les cellules de *B. subtilis* sont mobiles et favorisent le transport du cadmium sorbé sur les parois bactériennes. Cependant, sous certaines conditions, le transport des bactéries peut être limité du fait de l'adsorption des cellules bactériennes à la surface de la matrice poreuse et, par conséquent, le transport du cadmium est ralenti.

### **I-5-2. Conditions d'activation du transport de polluants associés aux colloïdes bactériens**

L'amélioration des connaissances sur le transport facilité de polluants par les biocolloïdes dans les milieux poreux est nécessaire pour des raisons sanitaires (contamination de l'eau par des polluants et pathogènes) mais aussi pour le développement de procédés utilisant des microorganismes pour la bioremédiation des sols et eaux contaminés. Concernant l'étude du transport de contaminants par les colloïdes, il faut s'intéresser aux mécanismes d'advection et de dispersion du polluant, à la sorption et désorption du contaminant à la matrice et à la sorption du contaminant sur les colloïdes et à sa désorption (Sen and Khilar, 2006). La mobilité des contaminants dans le sol dépend donc de leur distribution sur les phases solides mobiles et immobiles et dans la phase aqueuse mobile. De nombreux contaminants s'adsorbent fortement sur les phases solides et sont donc considérés immobiles (ex des métaux et radionucléides), on peut pourtant les retrouver très loin de leur source, indiquant que d'autres phases que l'eau (notamment solides mobiles) jouent un rôle dans leur mobilisation. Les principaux mécanismes de fixation des contaminants sur les colloïdes sont la complexation de surface, les échanges ioniques et la partition hydrophobe (pour les polluants organiques). Les quantités transportées ainsi que la mobilité des contaminants dépendent des caractéristiques de sorption à l'interface liquide-solide (qui dépend du pH, salinité, présence d'autres ions, température...). Les cations sont les polluants les plus étudiés en ce qui concerne leur transport. Ryan et Elimelech (1996) mentionnent que le premier critère pour observer du transport facilité de polluants est que les colloïdes doivent se trouver en quantité suffisante pour adsorber une quantité suffisante de polluants. Il est admis aujourd'hui que le transfert des polluants dans les sols résulte du couplage de trois processus : le transport aqueux, le transport colloïdal et les mécanismes de rétention sur la matrice (Sen and Khilar, 2006). Le transport aqueux dépend des mécanismes de convection et de dispersion hydrodynamique du polluant. Le transport colloïdal est contrôlé d'une part par la mobilité colloïdale elle-même et d'autre part par les propriétés d'interactions

(adsorption/accumulation) du polluant sur ces colloïdes. Le transport colloïdal dépend fortement des conditions biogéochimiques identifiées précédemment, telles que la taille et la concentration en colloïdes, la composition, le pH et la force ionique de la solution du sol, la vitesse d'écoulement. Enfin, la rétention des polluants dépend de plusieurs mécanismes physicochimiques responsables du piégeage des contaminants sur la matrice solide. Ces mécanismes sont identiques aux mécanismes passifs identifiés précédemment : il s'agit des phénomènes d'adsorption, de précipitation, de complexation, etc. (Mills *et al.*, 1991; Sigg *et al.*, 2000; Sen and Khilar, 2006).

La complexité du transport de cellules bactériennes en milieu poreux, due en particulier au caractère biologique et « actif » des bactéries en comparaison aux colloïdes « inertes », rend difficile et difficilement généralisable la compréhension et la modélisation de leur comportement dans les milieux poreux. Il apparaît cependant nécessaire de poursuivre la compréhension de ces mécanismes, notamment dans un but de meilleure compréhension du transport des bactéries pathogènes dans les sols et d'amélioration des procédés de bioremédiation. On a également vu dans les paragraphes précédents que les bactéries pouvaient prendre en charge les métaux via différents mécanismes (actifs ou passifs) compliquant ainsi la compréhension des mécanismes mis en jeu lors du transport facilité des métaux par les bactéries. De plus, les bactéries présentent des sensibilités aux métaux ainsi que des mécanismes d'interactions avec les milieux poreux qui leur sont propres, ce qui rend difficile de généraliser les processus de transport facilité des métaux par les biocolloïdes. Des études au cas par cas sont donc nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors du transfert facilité des métaux par les biocolloïdes.

## **I-6. Objectifs de la thèse et démarches expérimentales**

Cette étude s'inscrit dans la poursuite des travaux de thèse réalisés par Véronique Guiné en 2006 sur l'approche expérimentale et théorique de la réactivité de surface et de la mobilité des colloïdes bactériens en milieu poreux. Ce travail avait permis de caractériser les propriétés de surface de deux bactéries modèles et l'impact de ces interactions sur le transport du zinc et du cadmium dans un sable modèle faiblement réactif (sable de Fontainebleau).

Ce travail de thèse se concentre sur une meilleure compréhension des interactions bactéries métaux à l'échelle de la cellule et de l'effet de ces interactions sur le transport facilité de métaux dans les milieux poreux. Pour mettre en évidence le rôle que peuvent jouer les bactéries dans le transport des polluants, il est nécessaire de considérer d'une part les interactions entre les métaux et les bactéries et d'autre part les mécanismes de mobilisation et de transport des colloïdes vecteurs des métaux. Cette thèse a donc pour objectifs de mieux comprendre et de quantifier comment les cellules bactériennes prennent en charge les métaux lourds présents dans leur environnement et quels sont les effets de ces interactions sur le transport des métaux dans les sols. Pour cela, nous proposons de mener une étude couplée:

Dans un premier temps, nous nous intéressons à l'étude de la distribution subcellulaire du Zn et du Cd dans deux bactéries modèles. Ces deux métaux ont été choisis car ils sont souvent cités dans les problèmes de pollution métallique et bien que proches, ils présentent une toxicité différente. Le zinc est un oligoélément essentiel au fonctionnement des cellules bactériennes tandis que le Cd est un métal toxique à faible concentration qui n'a aucune fonction biologique connue. Les deux bactéries choisies présentent des sensibilités différentes aux métaux, *Escherichia coli* K12DH5α est sensible aux métaux alors que *Cupriavidus metallidurans* CH34 est connu pour ses capacités de résistance à de nombreux métaux lourds à forte concentration. Afin de mieux comprendre comment les bactéries prennent en charge les métaux il est nécessaire de développer une méthodologie permettant de quantifier les

métaux dans différents compartiments cellulaires bactériens. De plus, nous nous intéresserons également à l'effet de l'état physiologique des cellules bactériennes sur leurs capacités de bioaccumulation des métaux. Pour cela, les bactéries sont exposées aux métaux selon deux conditions : exposition avec les métaux pendant 2h à 4°C après croissance cellulaire (conditions passives) ou les cellules bactériennes se développeront en présence de métaux dans le milieu de culture à 30°C (conditions actives).

Dans une seconde partie, par une approche de dynamique des systèmes en colonnes de laboratoire, nous étudions la capacité des bactéries à faciliter le transport de métaux dans un sol naturel réactif, le sable d'Hostun HN34. Pour cela, il est nécessaire de s'intéresser dans un premier temps au transport des bactéries seules. L'originalité est de s'intéresser à l'apport de la cytométrie en flux pour l'énumération des bactéries dans les effluents de colonne. Puis dans un second temps, on s'intéressera à l'effet des cellules sur la remobilisation du Cd et du Zn retenus dans le milieu poreux. Pour cela nous étudions dans un premier temps le transfert des métaux en absence de bactéries afin de caractériser la réactivité de la matrice vis-à-vis des métaux modèles, puis le transfert des métaux en présence des bactéries modèles.

Une des originalités de ce travail concerne la prise en compte de multi pollutions métalliques pour se rapprocher des conditions naturelles où les microorganismes ont généralement à faire face à un cocktail de contaminants. Pour les deux approches, statiques et dynamiques, nous étudions donc l'effet de la présence du Cd et du Zn en mélange, à la fois sur la distribution subcellulaire mais également sur le transport, afin de voir si il y a des effets synergiques ou antagonistes entre les deux métaux.

Enfin, nous faisons le lien entre ces deux parties par la modélisation des phénomènes de transport observés en utilisant les constantes d'interactions bactéries/métaux obtenus d'après la première partie.

## **CHAPITRE II   Etude de la distribution subcellulaire des métaux chez les bactéries : Présentation et Méthodologie**



## II-1. Introduction

Les activités humaines, en particulier les activités industrielles, ont conduit à une augmentation et une redistribution des polluants, notamment des métaux lourds, dans l'environnement. Certains métaux sont essentiels pour les microorganismes (K, Na, Mg, Ca...) et participent au métabolisme des cellules (Lovley et Lloyd 2000; Gelabert et al. 2006). En revanche, certains éléments métalliques (Al, Ag, Cd, Sn, Hg...) sont toxiques pour les organismes. Certains microorganismes ont su répondre au cours du temps à cette toxicité en devenant tolérants ou résistants à ces métaux. Ils sont ainsi devenus capables de survivre dans des milieux hautement pollués. Ces aptitudes sont le résultat de mécanismes soit induits soit intrinsèques aux individus (Gadd 1992). Gadd (1992) a défini la tolérance comme la capacité de faire face à la toxicité des métaux au moyen des propriétés intrinsèques aux organismes. En parallèle, il décrit la résistance comme la capacité à survivre aux métaux toxiques par des mécanismes de détoxification en réponse directe à la présence de métaux dans l'environnement. Ces phénomènes montrent donc que, dans les sols, les cellules bactériennes entrent en contact avec les métaux au niveau de l'interface pariétal dont la traversée permet, par la suite, d'induire une réponse génétique de la cellule. Ces métaux peuvent ainsi être bioaccumulés par des phénomènes d'adsorption passive (indépendants du métabolisme) au niveau des membranes ou par transport actif à l'intérieur de la cellule (dépendant du métabolisme) (Ehrlich, 1997; Nies, 1999; Ledin, 2000; Haferburg and Kothe, 2007). Dans certains cas, il a également été observé la surproduction de substances polymériques extracellulaires très réactives par des microorganismes, en milieu naturel ou artificiel, pour se protéger des agressions du milieu et notamment des métaux (Guibaud et al., 2005; Bhaskar and Bhosle, 2006; Comte et al. 2006a; Morillo Pérez et al., 2008, ).

Pour mieux comprendre la manière dont les bactéries prennent en charge les métaux au niveau cellulaire, il est indispensable de comprendre et de modéliser les phénomènes de sorption sur les parois cellulaires ainsi que les mécanismes de métabolisation ultérieurs (internalisation, détoxification et efflux). Beaucoup d'études ont montré l'importance de l'interface paroi cellulaire/milieu dans cette prise en charge. Etant en contact avec le milieu extérieur, les constituants externes de la couche externe des cellules sont des lieux d'interaction privilégiés avec l'environnement (ions, métaux, pesticides, composants du sol...). Dans la plupart de ces études de biosorption des métaux par les bactéries, la membrane cellulaire est assimilée à une association de groupements fonctionnels de surface susceptibles de réagir avec les éléments extérieurs. La complexité des sites réactifs des parois cellulaires est souvent simplifiée en discrétisant la réactivité de la paroi à seulement 3 ou, au maximum, 4 sites réactifs globaux dont la réactivité individuelle est déterminée expérimentalement. Fein et al. (1997) ont ainsi proposé une modélisation de la sorption des métaux sur les cellules bactériennes qui implique 3 types de groupements fonctionnels acides (carboxyles et phosphodiesteres ;  $pK < 4.7$ ), neutres (phosphomonoesters ;  $pK \approx 7$ ) et basiques (amines et/ou hydroxyles ;  $pK > 8$ ). Plusieurs auteurs ont montré que de nombreuses bactéries à Gram- ou Gram+ présentaient une capacité de sorption des métaux comparable, et qu'un modèle de complexation « universel » pouvait être envisagé pour décrire la fixation des métaux par les cellules bactériennes et ainsi contribuer à mieux prédire le devenir des métaux dans les sols (Cox et al., 1999; Yee and Fein, 2001; Ngwenya et al., 2003). Toutefois, ce type de modélisation considère que la totalité des métaux biosorbés par les bactéries est retenue sur la paroi cellulaire des bactéries, ce qui est sans doute une hypothèse très forte car cela ne prend pas en compte les mécanismes d'internalisation des métaux et d'éventuels stockages internes, tel que cela a été suggéré récemment (Guiné et al. 2006, Pabst et al., 2010). En effet, Guiné et al. (2006, 2007) ont calculé que les membranes de trois bactéries modèles

présentaient une densité théorique de sites réactifs d'environ 2 sites par nm<sup>-2</sup>. En pratique il s'est avéré que ces bactéries étaient capables de fixer de 16 à 56 atomes de Zn ou de Cd par nm<sup>-2</sup>, démontrant ainsi que d'autres composants ou compartiments cellulaires que ceux de la paroi cellulaire doivent également retenir des métaux. Ainsi, il est probable que les bactéries peuvent internaliser des quantités importantes de métaux par diffusion passive ou transport actif, ou encore que les substances polymériques extracellulaires soient beaucoup plus réactives aux métaux que prévu, en raison à cause de leur composition ou de leur structure tridimensionnelle (Ha et al., 2010 ; Comte et al., 2008 ; Guibaud et al., 2007). On peut donc supposer que la biosorption sur les sites réactifs membranaires n'est qu'une étape préliminaire dans l'assimilation des métaux par les bactéries comme l'ont suggéré Campbell et al., (2002). Pour améliorer la modélisation des processus de biosorption des métaux par les cellules, et plus largement des polluants, il apparaît donc important de mieux comprendre la distribution des métaux à l'échelle subcellulaire qui va sans doute fortement contrôler la labilité des métaux retenus, c'est-à-dire la facilité avec laquelle ils seront relargués dans le milieu par les cellules.

C'est dans ce contexte que s'insère le premier chapitre de cette thèse, dont les objectifs sont de caractériser la distribution subcellulaire (membranaire et cytoplasmique) du zinc et du cadmium, seuls ou en mélange, dans deux bactéries modèles, *Cupriavidus metallidurans* CH34 et *Escherichia coli* K12DH5α. Pour cela nous avons appliqué trois techniques distinctes mais complémentaires, en développant spécifiquement, quand nécessaire une méthodologie adaptée.

Dans un premier temps nous avons tenté de visualiser directement la distribution subcellulaire des métaux dans les cellules et sur les membranes par des techniques récentes de microscopie électronique couplées à de la spectroscopie ou diffraction X. Nous avons testé différentes techniques de purification des cellules et de leurs organites (ultrafiltration), de préparation des échantillons (formation spécifique en microscopie électronique réalisée au CERMAV, à Grenoble) et de visualisation (Cryo-MEB et MET-FEG).

Dans une deuxième phase, nous avons essayé de caractériser de manière indirecte et directe cette distribution subcellulaire des métaux en appliquant ou en développant respectivement des procédures de fractionnement chimique et physique. La première méthode implique l'utilisation de ligands organiques forts pour extraire et quantifier spécifiquement les métaux retenus sur les parois cellulaires. Ce type d'approche a déjà été appliqué à d'autres types d'études (e.g. Hassler et al., 2004), qui ont montré que l'acide EthylèneDiamineTétraAcétique (EDTA) est le ligand le plus adapté pour déplacer puis retenir les cations présents sur les membranes bactériennes. Nous avons donc choisi d'appliquer cette approche à notre étude en prenant soin de considérer les inconvénients qu'elle présente et qui ont déjà été bien documentés, comme la libération du contenu de l'espace periplasmique des cellules vers le milieu extérieur au contact de l'EDTA (Vaara, 1992), pouvant fausser ainsi les résultats de distribution subcellulaire. De plus l'EDTA peut déstabiliser la membrane interne des bactéries à Gram- en chélatant les cations divalents, qui contribuent très largement au maintien de la cohésion de la couche de lipopolysaccharides (Leive, 1965), et, de ce fait, permettre le relargage de métaux initialement piégés dans le cytoplasme cellulaire (Mirimanoff & Wilkinson 2000; Smiejan et al. 2003; Hassler et al. 2004; Pabst et al. 2010). Nous avons donc dû mettre au point des conditions opératoires optimales pour nos objectifs spécifiques (concentration en ligand, temps de contact, composition du milieu réactionnel, ...).

Enfin, nous avons comparé les résultats de ce fractionnement chimique avec ceux obtenus par une méthode plus directe de mesure de la distribution subcellulaire des métaux qui a consisté à quantifier directement dans les compartiments d'intérêt (membranes et

cytoplasme) les teneurs en métaux après avoir procédé à leur obtention par la casse des cellules bactérienne sous haute pression (presse de French).

Ce chapitre présente donc les résultats que nous avons obtenus avec ces 3 approches. Ces résultats nous ont permis de valider la méthodologie la plus adaptée pour l'étude de la biosorption de métaux, seuls ou en mélange, par des bactéries actives.

## II-2. Matériel et méthodes

### II-2-1. Les métaux modèles

#### II-2-1-1. Le zinc

Le zinc est un élément métallique de symbole Zn et de numéro atomique 30. Il est principalement utilisé pour les revêtements de protection des métaux contre la corrosion (galvanoplastie, métallisation, traitement par immersion). Il entre dans la composition de divers alliages (laiton, bronze, alliages légers) et est également utilisé dans la construction immobilière, les équipements pour l'automobile, les chemins de fer et dans la fabrication de produits laminés ou formés. Il constitue un intermédiaire dans la fabrication d'autres composés de zinc et sert d'agent réducteur en chimie organique et de réactif en chimie analytique. L'origine du mot vient de l'allemand *zinke*, signifiant dent, en lien avec la forme des précipités formés lors de la préparation du zinc, à la sortie des fourneaux.

**Tableau II-1: Principales propriétés physico-chimiques du zinc et du cadmium (Bisson et al., 2005; Brignon and Malherbe, 2005).**

	<b>Zinc</b>	<b>Cadmium</b>
Masse atomique	65.38	112.14
Masse Volumique	7.18 g/cm <sup>3</sup>	8,6 g/cm <sup>3</sup>
Température de fusion	419.5°C	320.9°C
Température d'ébullition	906.9°C	765°C

#### II-2-1-2. Effets du zinc sur la santé

Le zinc est un oligoélément essentiel pour l'homme. Il est nécessaire au fonctionnement de nombreuses métalloenzymes (alcool déshydrogénases, phosphatases, ADN et ARN polymérase...). Il est donc indispensable pour maintenir un métabolisme normal des acides nucléiques, des protéines et des membranes et joue un rôle important dans la division cellulaire et le maintien de la structure des gènes. De ce fait, les effets toxiques du zinc peuvent être liés soit à une carence soit à une surexposition à ce métal (Bisson et al. 2005). Un excès de zinc peut provoquer des problèmes de santé importants (crampes d'estomac; irritations de la peau, vomissements, nausées, anémie). De très hauts niveaux de zinc peuvent endommager le pancréas et perturber le métabolisme des protéines. Sur le lieu de travail la contamination au zinc peut mener à un état comparable à la grippe, que l'on appelle la fièvre du fondeur.



### **II-2-1-3. Impact du zinc sur l'environnement**

Le zinc est présent naturellement dans l'air, l'eau et le sol. La plus grande partie du zinc est rejetée par les activités industrielles, telles que l'exploitation minière, la combustion du charbon et des déchets et l'industrie de l'acier. Les eaux naturelles sont polluées au zinc du fait de sa présence en grandes quantités dans les eaux usées, non traitées de façon satisfaisante, avec pour conséquence une redéposition du zinc sur les rives de rivières. A fortes doses, le zinc peut impacter les poissons, les plantes et s'accumuler dans les sols avant d'atteindre les nappes (Pardo et al., 2003). Le zinc est une sérieuse menace pour la production végétale dans les terres agricoles. Malgré cela les engrais contenant du zinc sont toujours utilisés. Enfin le zinc peut affecter l'activité biologique du sol, car il a une influence négative sur l'activité des micro-organismes et les vers de terre, impactant ainsi la décomposition de la matière organique (Bisson et al. 2005).

### **II-2-1-4. Le cadmium: généralités**

Le cadmium (symbole Cd) est un élément naturel, de numéro atomique 48, présent dans certains minerais sous forme d'impuretés. Ce métal était inconnu jusqu'au XIX<sup>ème</sup> siècle jusqu'à ce que ses caractéristiques physico-chimiques soient mises en évidence. Le nom de Cadmium vient du latin *cadmia*, « calamine », ancien nom donné au carbonate de zinc dont le cadmium était extrait aux environs de la ville de Thèbes (fondée par Cadmos) dont la citadelle porte le nom de *Kadmeia*, en français Cadmée. Le cadmium est abondamment utilisé dans des applications diffuses pour protéger l'acier contre la corrosion (cadmiage), dans les accumulateurs électriques (« piles » rechargeables) Ni-Cd ou comme stabilisant pour les plastiques et les pigments.

### **II-2-1-5. Effets du cadmium sur la santé**

Les divers composés du cadmium provoquent des effets toxiques variables selon leur solubilité, et donc selon leur facilité d'assimilation par l'organisme. Une exposition de courte durée à de fortes concentrations de poussières, de fumées ou de composés de cadmium est irritante pour les cellules des systèmes respiratoires et gastro-intestinaux. La principale préoccupation vis-à-vis du cadmium correspond aux possibilités d'exposition prolongée et à de faibles doses. L'essentiel du cadmium ingéré provient de végétaux à feuillage vert, salades, choux, épinards et dans une moindre mesure des céréales. La principale voie d'élimination du cadmium est l'urine, mais celle ci est très lente. L'accumulation du cadmium s'effectuant principalement dans les reins, cet organe est considéré, de ce fait, comme un organe « cible ». Concernant le risque de cancérogénicité, des résultats positifs ont été obtenus chez certains animaux (Brignon and Malherbe, 2005), bien qu'ils n'aient pas été confirmés par des enquêtes épidémiologiques récentes chez les travailleurs exposés aux composés de cadmium. Cependant, le comité mis en place par la Commission des Communautés Européennes a classé le sulfate et l'oxyde de cadmium comme cancérogènes « probables » par inhalation pour l'homme et le sulfure de cadmium comme cancérogène « possible » pour l'homme.

### **II-2-1-6. Impact du cadmium sur l'environnement**

Le cadmium est un élément assez rare. Dans la nature, on le trouve sous forme de divers composés minéraux et de complexes des chélateurs naturels. Bien que le cadmium ne trouve des applications utiles que depuis une époque assez récente, les métaux qu'il

accompagne généralement, comme le cuivre, le plomb et le zinc, sont employés depuis plusieurs millénaires. Par conséquent, la contamination de l'environnement s'est produite tout au long de cette période. Les nouvelles utilisations du cadmium n'ont fait qu'aggraver cette diffusion du métal. On le qualifie d'élément à utilisation dispersive, en raison de son introduction sans retenue dans l'environnement. Ce sont les déchets industriels et les ordures ménagères qui constituent les principales sources de pollution par le cadmium. La solubilité du cadmium dans l'eau dépend dans une large mesure de l'acidité de ce milieu. La dissolution du cadmium en suspension ou adsorbé sur les sédiments peut se produire lorsque le pH de l'eau diminue. Les fortes concentrations de cadmium dans l'air sont le lot des villes très industrialisées, notamment de celles qui ont des usines d'affinage et des fonderies. Les concentrations peuvent y être des centaines de fois supérieures à celles mesurées dans les régions non polluées. La présence de cadmium dans les végétaux peut provenir du dépôt d'aérosols sur les feuilles et autres parties aériennes, et de l'absorption du cadmium du sol par les racines. Les plantes en accumulent des quantités variables par cette voie car leur tolérance à l'égard du cadmium du sol varie selon les espèces. Certains mollusques et crustacés, tels les crabes et les huîtres, peuvent accumuler des concentrations de cadmium extrêmement élevées dans certains tissus.

En conclusion, les deux métaux modèles de notre étude présentent des niveaux de toxicité très différents, le zinc étant un oligoélément contrairement au cadmium qui n'est pas indispensable à la vie. De plus comme décrit dans le paragraphe I-2-3, les microorganismes présentent des mécanismes de résistance et de prise en charge différents pour les deux métaux.

#### **II-2-1-7. Analyses chimiques**

Les deux métaux modèles sont analysés par Spectroscopie d'Émission Atomique et Optique (ICP-AES Perkin Elmer, Optima 3300 DV ; ICP-OES Varian ES-OES) (Figure II-1). Pour les échantillons dont la concentration en métal est très basse, les métaux ont été dosés par spectrométrie de masse (ICP-MS, Agilent 7500ce) (Figure II-1) après digestion des échantillons à l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) concentré.

Le principe analytique de la spectroscopie atomique est basé sur la propriété des atomes d'émettre ou d'absorber des rayonnements électromagnétiques spécifiques sous certaines conditions physiques. A cette fin, il est nécessaire de libérer les éléments devant être étudiés dans un échantillon à partir de leurs composés, en général par un apport d'énergie, et de les rendre disponibles sous forme de particules libres. La spectrométrie de masse élémentaire utilise le fait que des particules électriquement chargées peuvent être séparées et détectées dans un spectromètre de masse par l'apport d'énergie.

En spectroscopie d'émission atomique et optique (AES et OES), on procure à l'échantillon atomisé de l'énergie thermique, à l'aide d'argon, permettant de faire passer les atomes à un état excité et également de les ioniser.

En spectrométrie de masse (ICP-MS), de l'énergie thermique est transférée aux éléments par un plasma couplé par induction à des températures encore plus élevées dans le but de produire préférentiellement des particules électriquement chargées, qui peuvent être analysées dans un spectromètre de masse. Ces ions sont séparés en fonction de leur charge électrique et de leur masse, permettant d'obtenir des informations analytiques pour chaque isotope d'un élément. La capacité de détection est ici très bonne, ce qui signifie que cette technique est devenue le procédé classique pour l'analyse des ultra traces élémentaires.

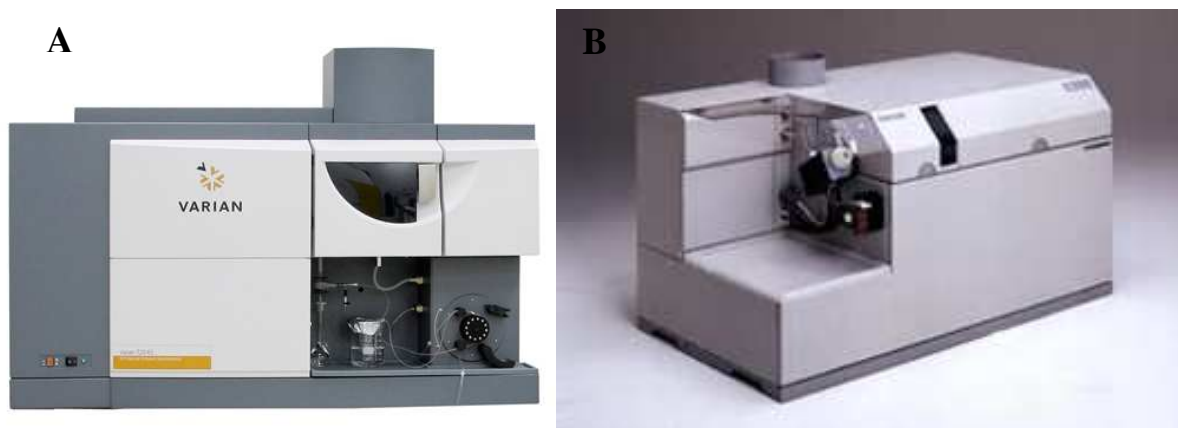


Figure II-1: Photographie de l'ICP-OES Varian 720ES-OES (A) et de l'ICP-MS, Agilent 7500ce (B) utilisés pour les quantifications du Zn et du Cd.

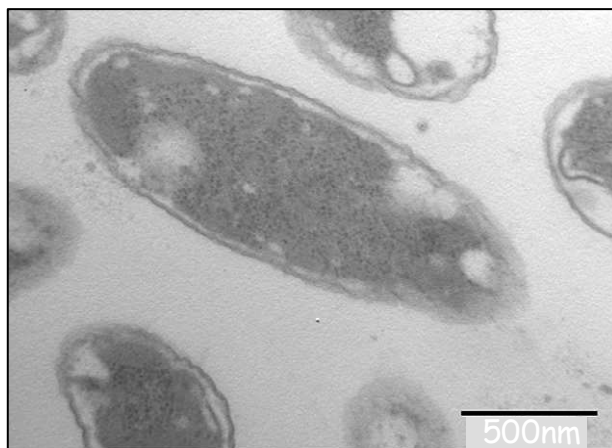
## II-2-2. Les bactéries modèles

### II-2-2-1. Choix des souches

Les deux colloïdes bactériens choisis pour cette étude sont *Escherichia coli* K12DH5 $\alpha$  et *Cupriavidus metallidurans* CH34 (Mergeay et al., 1987). Ces deux souches ont été choisies en raison de leur sensibilité différente vis-à-vis des métaux lourds. *C. metallidurans* CH34 est résistante à de nombreux métaux (dont Cd et Zn) alors que *E. coli* K12DH5 $\alpha$  est une souche sensible au Cd et aux fortes concentrations de Zn. De plus ces deux souches sont bien connues au laboratoire et déjà bien caractérisées par Guiné (2006).

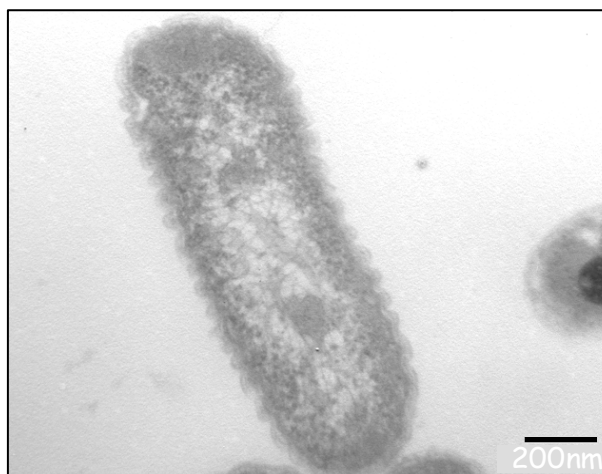
*Escherichia coli* est une bactérie à Gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae. C'est un hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux). Elle constitue alors tout au long de la vie de l'hôte, l'espèce bactérienne dominante de la flore aérobie intestinale. *E. coli* est sans doute l'organisme vivant le plus étudié à ce jour : en effet, l'ancienneté de sa découverte (en 1885 par Théodore Escherich) et sa culture aisée (division cellulaire toutes les 20 minutes à 37 °C dans un milieu riche) en font un outil d'étude de choix. *E. coli* est utilisée comme indicateur de la qualité bactériologique de l'eau depuis qu'elle a été isolée pour la première fois dans des matières fécales, à la fin du XIXe siècle. Il existe des centaines de souches d'*E. coli*, dont la plupart sont sans danger et vivent dans l'intestin des humains et des animaux. Mais certaines souches peuvent causer de graves problèmes de santé (diarrhée sanglante grave, crampes abdominales et parfois de la fièvre pouvant causer la mort).

La souche *E. coli* K12DH5 $\alpha$  (Figure II-2) utilisée lors de cette étude porte un plasmide qui la rend fluorescente : le plasmide *pGreenTir* qui porte le gène *gfp* (green fluorescent protein) issu de la méduse *Aequora victoria*. Nous avons également à notre disposition la même souche bactérienne qui porte un plasmide avec le gène *yfp* (yellow fluorescent protein).



**Figure II-2:** Cellules d'*Escherichia coli* K12Dh5a observées en microscopie électronique à transmission (Guiné, 2006).

*Cupriavidus metallidurans* CH34 est une bactérie à Gram négatif, non sporulante, aérobie à anaérobie facultative, appartenant à la famille des bêta-protéobactéries (Figure II-3). Ce micro-organisme est aussi connu sous les anciens noms de *Ralstonia eutropha*, *Wautersia metallidurans*, *Alcaligenes eutrophus* et *Ralstonia metallidurans*. Elle a été isolée en 1976 par Christian Houba dans les sédiments de l'usine métallurgique de Prayon située à Engis près de Liège en Belgique (Mergeay et al., 1987). Cette bactérie est capable de survivre à des concentrations millimolaires de nombreux métaux lourds tels que le zinc, cadmium, cobalt, nickel, cuivre, chrome, mercure et le plomb. Cette multi-résistance aux métaux lourds est portée par deux grands plasmides pMOL28 (171 kb) et pMOL30 (234 kb) (Monchy et al., 2007; Rozycki and Nies, 2008). Des expériences menées par Guiné (2006) ont permis de déterminer les concentrations minimales d'inhibition (CMI) par le zinc (16mM) et par le cadmium (2mM) de la croissance de cette bactérie.



**Figure II-3:** Cellule de *Cupriavidus metallidurans* CH34 observée en microscopie électronique à transmission (Guiné, 2006).

#### II-2-2-2. Milieux de cultures

Pour toutes les expériences de cette étude, les souches bactériennes sont cultivées à partir d'une colonie isolée, en milieu liquide pendant 48 heures, en aérobie, à 30°C et sous agitation constante (200 rpm). La colonie est prélevée sur boîte de Pétri conservées à 4°C ou à partir de stocks bactériens conservés à -80°C dans un mélange (1:1) glycérol - culture

concentrée. Pour les expériences, les cellules sont cultivées en milieu riche (Luria Bertani, LB) ou en milieu minéral (Tris Salt Medium, TSM pour *C. metallidurans* CH34 et M9 pour *E. coli* K12DH5α). La composition des milieux est donnée dans le Tableau II-2.

**Tableau II-2: Composition des différents milieux de culture des bactéries modèles**

<b>Luria Bertani (LB)</b>	<b>Tris Salt Medium (TSM)</b>	<b>M9</b>
Bactotryptone	Tris (50mM)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2H <sub>2</sub> O 6.4g/L
(tryptone) 10g/L	NaCl (80mM)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.5g/L
Extrait de levure 5g/L	KCl (20mM)	NaCl 0.25g/L
NaCl 5g/L	NH <sub>4</sub> Cl (20mM)	NH <sub>4</sub> Cl 0.5g/L
(Agar 13g/L)	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3mM)	CaCl <sub>2</sub> 0.1mM
Ajuster le pH	MgCl <sub>2</sub> – 6H <sub>2</sub> O (1mM)	MgSO <sub>4</sub> 2mM
H <sub>2</sub> O qsp 1L	CaCl <sub>2</sub> – 2H <sub>2</sub> O (200μM)	Ajustement pH 6
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 12H <sub>2</sub> O (1.3mM)	Glucose 1% final
	Fe(NH <sub>4</sub> ) citrate 0.0048% final	H <sub>2</sub> O qsp 1L
	ZnCl <sub>2</sub> (0.5μM)	
	MnCl <sub>2</sub> – 4H <sub>2</sub> O (0.5μM)	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (1μM)	
	CoCl <sub>2</sub> – 6H <sub>2</sub> O (0.8μM)	
	CuCl <sub>2</sub> – 2H <sub>2</sub> O (0.1μM)	
	NiCl <sub>2</sub> – 6H <sub>2</sub> O (0.1μM)	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> – 2H <sub>2</sub> O (0.15μM)	
	Gluconate 0.2% final	
	Ajuster le pH	
	H <sub>2</sub> O qsp 1L	

### II-2-2-3. Caractéristiques morphologiques des bactéries étudiées

De nombreux tests ont été effectués par Guiné (2006) sur les deux souches bactériennes afin de caractériser leurs propriétés de surface. Nous ne présenterons ici que les résultats des principales propriétés de ces deux bactéries modèles. Les deux souches sont des bactéries à Gram négatif, en forme de bâtonnet. *E. coli* K12DH5α est plus grande que *C. metallidurans* CH34 et possède donc une surface spécifique plus faible. Les données morphologiques des deux espèces sont indiquées dans le Tableau II-3.

**Tableau II-3: Caractéristiques morphologiques des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 et *Escherichia coli* K12DH5a (Guiné, 2006 et cette étude).**

	<i>C. metallidurans</i> CH34	<i>E. coli</i> K12DH5a
Longueur moyenne (en $\mu\text{m}$ )	<b>1.2</b> ( $\pm 0.1$ )	<b>2.1</b> ( $\pm 0.2$ )
Diamètre moyen (en $\mu\text{m}$ )	<b>0.4</b> ( $\pm 0.04$ )	<b>0.6</b> ( $\pm 0.06$ )
Surface équivalente (en $\mu\text{m}^2$ )	<b>0.15</b> ( $\pm 0.02$ )	<b>0.59</b> ( $\pm 0.06$ )
Volume équivalent (en $\mu\text{m}^3$ )	<b>1.76</b> ( $\pm 0.18$ )	<b>4.52</b> ( $\pm 0.45$ )
Masse sèche (g UFC <sup>-1</sup> )	<b>8.19</b> $10^{-13}$ ( $\pm 1.10^{-13}$ )	<b>1.17</b> $10^{-12}$ ( $\pm 2.10^{-13}$ )
Masse volumique sèche (g $\mu\text{m}^{-3}$ )	<b>5.43</b> $10^{-12}$ ( $\pm 1.10^{-12}$ )	<b>1.97</b> $10^{-12}$ ( $\pm 3.10^{-13}$ )
Nombre de cellules par unité de Densité		
Optique (UFC DO <sup>-1</sup> )	<b>4</b> $10^8$ ( $\pm 7.10^7$ )	<b>1</b> $10^9$ ( $\pm 7.10^7$ )
Teneur en eau (%)	<b>87.9</b> ( $\pm 2.7$ )	<b>88.6</b> ( $\pm 2.4$ )
Teneur en carbone (%)	<b>47.6</b> ( $\pm 0.7$ )	<b>46.6</b> ( $\pm 0.4$ )
Teneur en azote (%)	<b>10.8</b> ( $\pm 0.1$ )	<b>12.2</b> ( $\pm 0.1$ )
Teneur en phosphate (%)	<b>1.5</b>	<b>1.6</b>
Teneur en soufre (%)	<b>0.44</b>	<b>0.64</b>

#### II-2-2-4. Caractérisation de la réactivité membranaire des deux bactéries modèles

Des courbes de titrations acides bases ont été réalisées pour les deux espèces afin d'étudier leur capacité d'échange de protons (Guiné et al. 2006). Entre pH4 et 10, *C. metallidurans* CH34 échange deux fois plus de protons que *E. coli* K12DH5a. Cette différence est surtout perceptible pour les pH acides. Trois zones de pH spécifiques ont pu être identifiées : de pH 4 à 5.5, de pH 6 à 8, de pH 8.5 à 10. De plus les pentes sont plus fortes pour les gammes de haut et bas pH que pour les pH de 6 à 8. Cela s'explique par des différences de déprotonation de sites de surface selon le pH. Il a ainsi été défini qu'au moins deux sites de surface échangeaient des protons à bas et haut pH pour les 2 souches étudiées. Il faut également noter que pour les pH extrêmes, les pentes des courbes ne sont pas nulles ce qui indique l'existence d'autres sites d'échanges de protons. Toutefois la non prise en compte de ces sites reste cohérente lorsque que l'on s'intéresse aux conditions naturelles où les pH n'atteignent que très rarement des valeurs extrêmes de pH (< 4 et > 10).

Il est également possible de modéliser les échanges de protons par les surfaces membranaires des cellules bactériennes. Un modèle fréquemment utilisé est celui introduit par Yee and Fein (2001) qui assimilent la complexité de la réactivité des membranes bactériennes à celle de seulement trois types de sites : carboxyliques à pH acide, phosphates à pH neutre et hydroxyles et/ou amines à pH basique. Guiné (2006) a déterminé les constantes de déprotonation et les densités de sites réactifs de la paroi des deux bactéries étudiées dans notre étude (Tableau II-4).

**Tableau II-4 : Constantes de déprotonation et de complexation du cadmium et du zinc sur les cellules bactériennes de *Cupriavidus metallidurans* CH34 et d'*Escherichia coli* DH5α (Guiné, 2006)**

	Echange de proton $R-XH \leftrightarrow R-X^- + H^+$			Complexation du Cd $R-X^- + Cd^{2+} \leftrightarrow R-XCd^+$			Complexation du Zn $R-X^- + Zn^{2+} \leftrightarrow R-XZn^+$		
	$pK_C/[T_{CH}]$	$pK_P/[T_{PH}]$	$pK_N/[T_{NH}]$	$\log K_{CCd}$	$\log K_{PCd}$	$\log K_{NCd}$	$\log K_{CZn}$	$\log K_{PZn}$	$\log K_{NZn}$
<i>C. metallidurans</i> CH34	3,9/0,42	6,8/0,12	9.4/0,45	3,6	4,7	5,0	2,2	4,2	5,6
<i>E. coli</i> K12DH5α	4,6/0,25	6,8/0,07	9.2/0,25	4,4	5,0	5,9	3,5	5,5	6,7

### II-2-2-5. Réactivité des cellules bactériennes au zinc et au cadmium

Un nombre croissant d'études s'est intéressé à la réactivité des bactéries aux métaux (Beveridge, 1989; Plette et al., 1996; Chang, 1997; Fein et al., 1997; Ledin, 2000; Yee and Fein, 2001, 2001). Guiné et al. (2006) se sont intéressés à la sorption du zinc et du cadmium sur les deux souches bactériennes modèles par des analyses combinées de titration, de modélisation et de spectroscopie EXAFS. Ces études ont permis de déterminer les isothermes de sorption du zinc et du cadmium sur les cellules des deux souches bactériennes et de déterminer les caractéristiques ( $pK$  et densité de sites) des sites réactifs impliqués dans les interactions avec Zn et Cd (Tableau II-4). Depuis quelques années, divers modèles de complexation de surface des métaux ont été proposés (Fein et al., 1997; Cox et al., 1999; Yee and Fein, 2001). Ces modèles de complexation de surface sont des outils quantitatifs permettant d'estimer la quantité de métal sorbé sur les surfaces géologiques incluant les minéraux et les bactéries. Ils sont capables de simuler les propriétés acido-basiques et de complexation des particules colloïdales en fonction non seulement de la concentration en ions mais également du pH et de la force ionique. Ils permettent des calculs prédictifs pour une large gamme de conditions, supérieure à celle directement testée en laboratoire. Les parois bactériennes contiennent une multitude de sites de surface réactifs constitués des sucres, protéines ou acides gras (Guiné et al., 2006). Une fois déprotonés, ces sites sont susceptibles d'intervenir dans la fixation des métaux suivant l'équilibre thermodynamique suivant:



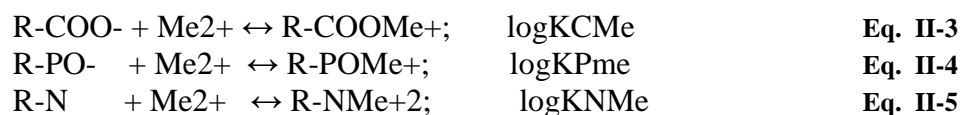
avec  $R-X^-$ , le groupement fonctionnel déprotoné ( $X^-$ ) associé à la surface de la bactérie ( $R$ ) et réagissant avec les cations métalliques  $Me^{2+}$ .

La constante de la réaction est alors définie par:

$$K = \frac{[R-XMe^+]}{[R-X^-]a_{Me^{2+}}} \quad \text{et} \quad pK = -\log(K) \quad \text{Eq. II-2}$$

avec  $a$ , l'activité des cations métalliques ; les « [ ] » pour la concentration molaire en sites de surface et  $K$  la constante thermodynamique d'affinité.

Les principaux groupes fonctionnels considérés à la surface des bactéries sont généralement les groupements carboxyles, phosphodiesteres, phosphomonoesters, amines, hydroxyles et plus récemment sulfhydriles (Guiné et al., 2006; Ueshima et al., 2008; Mishra et al., 2009) non considérés ici. En supposant un rapport stœchiométrique de 1:1 entre les sites déprotonés et les cations métalliques, on aura donc les réactions suivantes à la surface des cellules bactériennes :



### II-2-3. Conditions d'exposition des bactéries aux métaux

Pour l'étude de la biosorption et de la distribution des métaux à l'échelle subcellulaire, les cellules bactériennes sont préalablement cultivées en absence de métal pendant 48 heures dans leur milieu minéral respectif. En fin de croissance exponentielle, les cultures sont centrifugées à 5000 g pendant 10 minutes. Le culot bactérien est alors lavé trois fois avec de l'eau distillée stérile. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans des solutions de zinc ou de cadmium à 0,  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$  M afin d'obtenir des échantillons de 20 mL à une concentration bactérienne finale de  $1g.L^{-1}$ . Ces échantillons sont alors incubés 2 heures à 4°C, température permettant d'inactiver les cellules et donc de limiter au maximum leur métabolisme actif (transport actif, synthèse de polymères...). Nous considérons donc uniquement l'assimilation métallique passive par les cellules bactériennes, comme décrit par Guiné et al. (2007).

### II-2-4. Technique de caractérisation des nanogranules extracellulaires

Afin de caractériser l'éventuelle surproduction de polymères dans le milieu extracellulaire par les bactéries en réponse à la présence de métaux, un protocole a été mis au point pour récupérer les macromolécules de différentes tailles moléculaires susceptibles de retenir les métaux étudiés. Pour cela, des ultrafiltrations successives ont été effectuées avec des filtres de polyéthersulfone de maille décroissante allant de 100000 à 2000 Da (Sartorius Vivaspin). Les cellules qui se sont développées en présence ou non de métaux sont dans un premier temps séparées du contenu extracellulaire par filtration à 0.22µm. Ensuite le milieu extracellulaire dépourvu des cellules subit trois ultrafiltrations successives à des mailles de 100000, 5000 et 2000 Da. Entre chaque filtration, un aliquot du surnageant est stocké à -20°C pour quantification ultérieure. En fin d'expérience, les filtres sont coupés en deux : une partie pour quantification directe des métaux après digestion à l'eau régale ( $HNO_3/HCL$  à 1N) et l'autre partie pour observation en microscopie électronique (MEB-FEG). Trois conditions expérimentales ont été testées: *C. metallidurans* CH34 en présence de Cd  $10^{-4}M$ , *E.coli* K12DH5α en présence de Cd  $10^{-4}M$  et une solution témoin de Cd  $10^{-4}M$  sans cellules bactériennes pour tester la réactivité des filtres aux métaux.

### II-2-5. Technique de fractionnement chimique à l'EDTA

Pour caractériser la distribution des métaux à l'échelle subcellulaire, une extraction à l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) a été utilisée afin de déterminer les proportions de métaux associés aux **membranes**, au **cytoplasme** et dans le compartiment **extracellulaire**. Après 2 heures d'exposition au zinc et au cadmium, les cultures sont centrifugées pendant 10 minutes à 5000g afin de séparer les cellules (culot) de leur milieu. Le surnageant correspond au **compartiment extracellulaire** (métal libre et éventuellement lié aux EPS libres). A cette étape un aliquot de culot est stocké pour mesurer la quantité totale de métal fixée par les bactéries. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 15 mL d'une solution d'EDTA  $10^{-2}M$  à pH6 préparé dans du tampon 2-(N-Morpholino)Ethane Sulfonic (MES) à  $10^{-2}$  M avec des temps croissants de contact entre les cellules et l'EDTA : 1, 2, 5 et 10 minutes. Après le



contact avec l'EDTA, les suspensions sont centrifugées 5 minutes à 5000g. Le surnageant représente le **compartiment membranaire** (métaux extraits des membranes cellulaires par l'EDTA) et le culot correspond au **compartiment intracellulaire**. Le protocole est schématisé dans la Figure II-4.

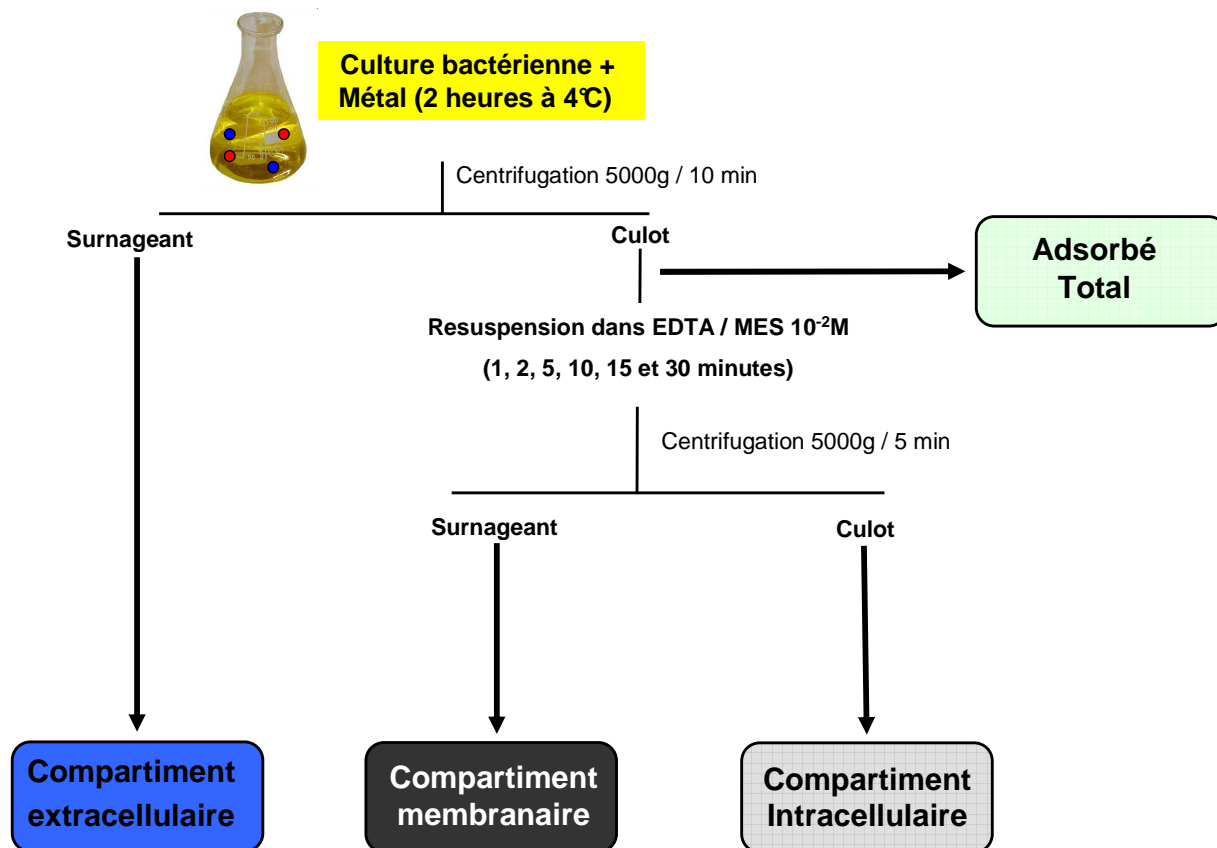


Figure II-4: Protocole de fractionnement chimique, à l'EDTA, des métaux biosorbés sur les bactéries.

## II-2-6. Technique de fractionnement physique des cellules

La méthode de fractionnement physique des bactéries a été adaptée de (Martins, 1989) et de (Okamura and Aoyama, 1994) en simplifiant les protocoles afin de travailler uniquement avec de l'eau distillée stérile pour éviter d'éventuelles compétitions avec des ligands organiques utilisés dans les protocoles initiaux et pouvant complexer les métaux et donc fausser les résultats. Cette méthode consiste à appliquer une forte pression aux cellules, à l'aide d'une presse de French (Figure II-5), afin de casser ces dernières, puis de séparer les fragments de membranes du contenu intracellulaire par ultracentrifugation.



Figure II-5 : Presse de French et sa cellule de pression (Bioritech)

Les culots bactériens, récoltés après culture en milieu minéral et exposition aux métaux à 4°C ont été fractionnés physiquement à l'aide d'une presse de French (Bioritech). Largement utilisée en biologie cellulaire dans des études de compartimentation, la presse de French permet de casser de nombreux types de cellules en les soumettant à de fortes pressions.

Les cellules culottées sont resuspendues dans 20mL d'eau déminéralisée stérile et sont soumises à une pression de 1200 kgf/cm<sup>2</sup> dans la presse de French. La casse cellulaire a été répétée trois fois pour garantir un taux de casse proche de 100%. Après la casse des cellules, une première centrifugation à 5000 g pendant 5 minutes est réalisée afin de récolter les cellules non cassées (culot 1). Puis les compartiments membranaires et intracellulaires sont séparés par ultracentrifugation à 20000 g pendant 20 min (Ultracentrifugeuse L70, Beckman). Le surnageant ainsi obtenu, qui contient le cytoplasme cellulaire (mentionné comme le **compartiment intracellulaire**) et le culot 2 (correspondant au **compartiment membranaire**) sont stockés à -20°C avant analyse. Le protocole est schématisé dans la Figure II-6.

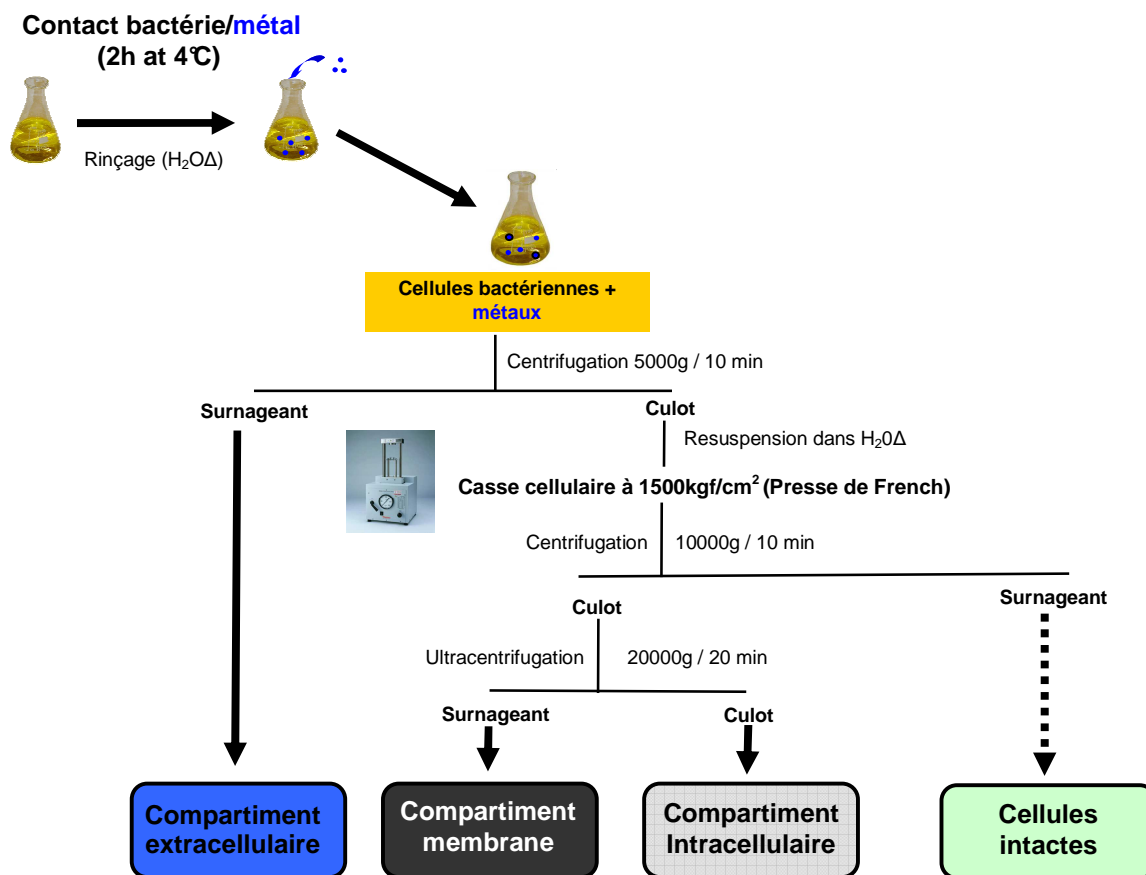


Figure II-6: Schéma du protocole de fractionnement physique des bactéries (Presse de French).

## II-2-7. Techniques de microscopie électronique

### II-2-7-1. Microscopie Electronique à Transmission (MET) et à Balayage (MEB)

Dans le cadre de l'étude de la distribution subcellulaire des métaux chez les bactéries, des observations au Microscopie Electronique à Transmission (MET) et à Balayage (MEB) ont été réalisées. Les observations sont réalisées soit après inclusion des suspensions bactériennes dans une résine, soit directement déposées sur une grille support. Dans le premier cas, des sels de métaux lourds (osmium, uranium ou plomb) sont utilisés pour renforcer le contraste. Ces préparations ont été réalisées au Centre Technologiques des Microstructures de Lyon (MET Philips CM120 - 80 keV) en collaboration avec Roland Hellmann de l'ISTerre de Grenoble. Afin de compléter ces résultats, lors d'une formation en Microscopie Electronique à Transmission (MET Philips CM200 - 80 keV) réalisée au Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales de Grenoble (CERMAV), des échantillons de compartiments membranaires obtenus après fractionnement physique des cellules de *C. metallidurans* CH34, en présence ou non de cadmium à  $10^{-4}$  M, ont pu être observés. Les échantillons de membrane ont été préparés par coloration négative après les expériences de casse cellulaire. Cette technique consiste dans un premier temps à adsorber les échantillons sur une grille métallique recouverte d'un film de carbone fin. L'excès d'eau est enlevé puis une solution contenant un agent contrastant, du tétrahydroxyde d'osmium ou de l'acétate d'uranyle, est ajouté sur

la grille pendant quelques secondes puis absorbé. Celui-ci va se fixer préférentiellement au bord des particules adsorbées. De par sa forte masse atomique, le contrastant va dévier les électrons dans le diaphragme objectif. Ainsi l'échantillon biologique apparaît plus clair que ce qui l'entoure, d'où le nom de coloration négative.

Lors des expériences de caractérisation des nanogranules cellulaires par ultrafiltration, une partie des filtres récupérés a été observée au Consortium des Moyens Technologiques Communs à Grenoble (CMTC), en MEB-FEG (MEB Zeiss Gemini ultra55) de haute résolution (de l'ordre du nm) et couplé à un analyseur X (EDX), dans le but d'observer les macromolécules porteuses de métaux susceptibles d'être retenues par les différents filtres. L'avantage de cet appareil est d'offrir une plus meilleure résolution qu'un MEB classique. Les fragments de filtres d'ultrafiltration sont recouverts d'un film de carbone avant observation directe.

#### **II-2-7-2. Cryo-Microscopie Electronique à Transmission (CryoMET)**

Des tests de cryo-microscopie électronique des spécimens vitrifiés (CEMOVIS CryoElectron Microtomy of Vitrous sections) ont également été réalisés en collaboration avec R. Hellmann (ISTerre) afin de limiter au maximum les artefacts dus à la préparation des échantillons en microscopie électronique classique. Les échantillons subissent d'abord une cryofixation (M. Sachse, Institut Pasteur) consistant à geler rapidement l'échantillon à l'azote liquide, afin que l'eau forme de la glace vitreuse (non cristalline). Ceci permet de préserver les cellules dans leur état original et permet d'observer des échantillons de pratiquement tous les types biologiques dans un état proche de leur état naturel. Après cryofixation, les échantillons ont été observés au Cryo-Microscope Electronique à Transmission (Cryo-MET) au centre de microscopie de Jussieu (avec l'aide de J.M. Guignier) et à IPMC de Paris. Ces expériences ont été réalisées sur des échantillons de *C. metallidurans* CH34 mis en contact avec du cadmium selon deux types d'exposition au métal :

- Culture des cellules en milieu minéral TSM en absence de Cd pendant 48h puis mise en contact des cellules lavées avec 100ppm de Cd ( $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ), à 4°C pendant 24h. qui correspond à des conditions passives d'exposition (cellules inactives).
- Culture des cellules pendant 48h à 30°C, en milieu minéral TSM contenant 100 ppm de Cd ( $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ). Dans ce cas les cellules se sont développées en contact permanent avec le Cd correspondant à des conditions actives d'exposition (cellules actives).

### **II-3. Résultats**

#### **II-3-1. Observation directe de la distribution subcellulaire des métaux**

##### **II-3-1-1. Visualisation en microscopie électronique**

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'interactions des bactéries modèles vis-à-vis des deux métaux, une étude précédente conduite au laboratoire (Guiné 2006, Desauvey et al. 2009) avec une approche de microscopie électronique à Transmission (MET) et à Balayage (MEB) couplée à de la diffraction X, avait suggéré l'accumulation importante de métaux sur les membranes cellulaires, mais surtout au niveau du cytoplasme des cellules de *Escherichia coli* K12DH5α (Figure II-7). Bien que seulement semi-quantitative, les analyses en diffraction

X ont montré de manière surprenante que l'accumulation intracellulaire semble importante chez *E. coli* K12DH5 $\alpha$ , pourtant sensible aux métaux. La faible sensibilité de cette technique et la possibilité que les échantillons aient subi des artefacts dus aux nombreux produits utilisés pour la préparation des échantillons (susceptibles de modifier les interactions entre les cellules et les métaux), nous ont conduit à renouveler cette étude mais avec des traitements d'échantillons plus adaptés et des outils de microscopie plus puissants en termes de résolution et de sensibilité. Nous avons par ailleurs utilisé des concentrations de Zn beaucoup plus faibles que celles utilisées dans la première étude, beaucoup trop élevées et ne correspondant pas aux concentrations rencontrées habituellement.

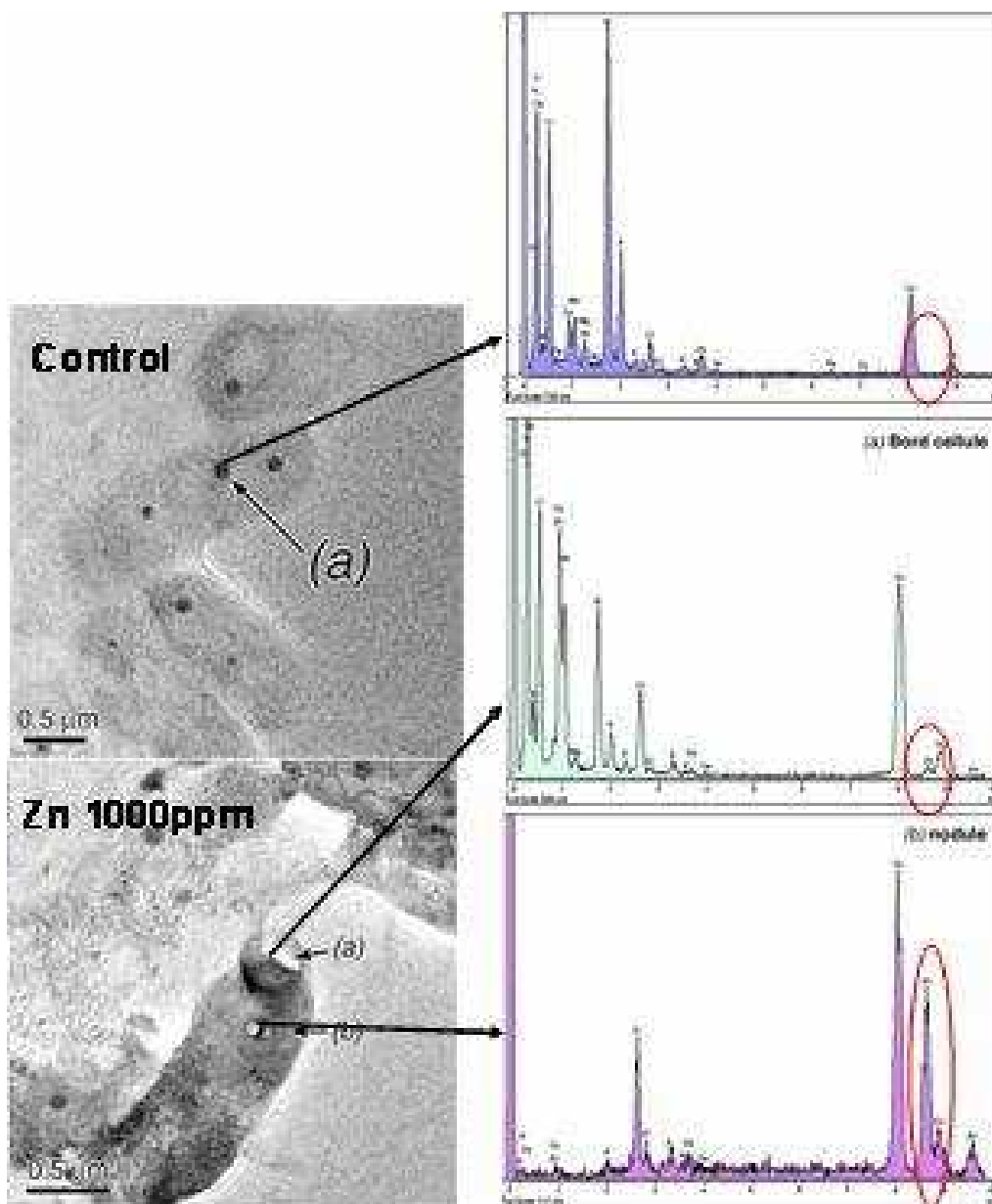
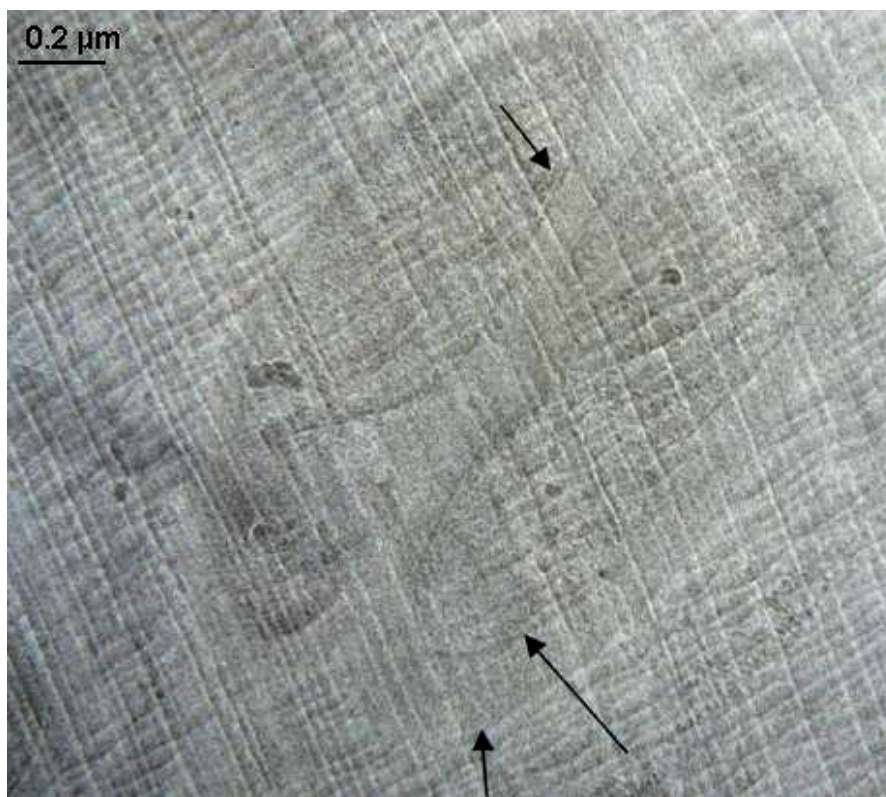


Figure II-7: Observations au MET de cellules de *Escherichia coli* K12DH5 $\alpha$  mise en contact ou non avec du zinc (1000ppm) et analyse EDX au niveau des granules intracellulaire (Guiné 2006, Desaunay et al., 2009).

Pour valider et améliorer ces résultats, notamment à faible concentration métallique, nous avons donc mené des observations de nos cellules ayant biosorbées le cadmium ou le zinc en cryomicroscopie (CEMOVIS). Les résultats sont présentés sur les Figures II-8 et II-9.

Un lot contrôle contenant uniquement des cellules bactériennes sans Cd a été analysé. Les analyses EDX ont permis de montrer la présence de C, O, P et S (ce dernier en limite de détection). Les observations ont permis de montrer clairement la structure des parois bactériennes, confirmant ainsi la bonne conservation de la structure par cryofixation (Figure II-8).



**Figure II-8:** Observations au Cryo-MET de cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34.

Les résultats de visualisation de la biosorption du Cd sur les cellules inactivées de *C. metallidurans* CH34 sont présentés dans la Figure II-9-A. Cette figure montre la présence de nanoparticules de 100 nm à quelques microns, agglomérées autour des cellules. En revanche, il n'a pas été possible de détecter de Cd ni au niveau des cellules, ni au niveau de ces nano-granules.

En conditions actives d'exposition au Cd (Figure II-9-B), les cellules présentent un aspect physiologique stressé, les parois cellulaires apparaissent crénelées, indiquant un stress dû à la présence de Cd dans le milieu de culture. La plupart des cellules étaient isolées et dans un état de non division contrairement aux échantillons témoins sans cadmium. Les floccs de nanoparticules observés précédemment sont également présents et les analyses EDX ont pu mettre en évidence cette fois la présence de Cd associé à ces nano-granules mais à des teneurs assez faibles Figure II-9-B. Ces agrégats sont très rarement observés au contact direct des cellules. Les analyses EDX ont aussi montré que les floccs sont assez riches en phosphore.



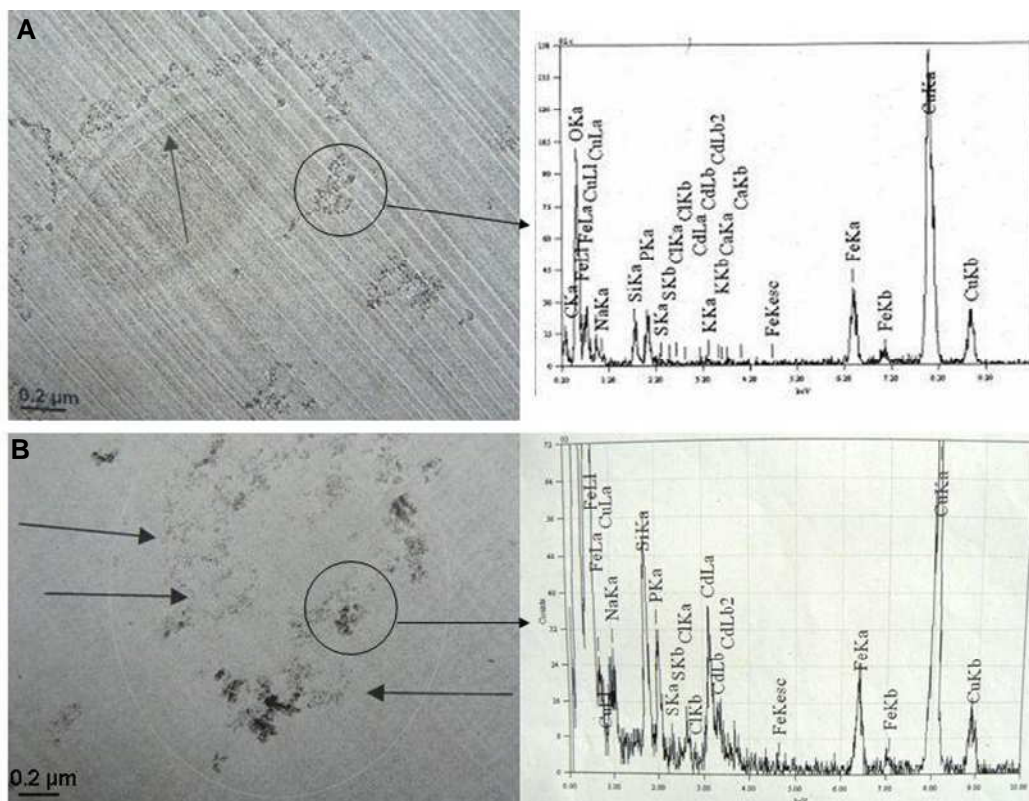


Figure II-9: Observations au Cryo-MET de cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 mise en contact avec du cadmium ( $10^{-4}$ M) selon des conditions d'exposition : A/ passive ( $4^{\circ}\text{C}$ ) ou B/ active ( $30^{\circ}\text{C}$ ) et analyse EDX au niveau des granules extracellulaire.

### II-3-1-2. Etude des nanobiogranules riche en Cd

Afin de caractériser ces nanoparticules extracellulaires, nous avons développé un protocole expérimental basé sur des ultrafiltrations successives associé à du MEB-FEG, censé nous permettre d'isoler, visualiser et de quantifier les nanoparticules enrichies en Cd observées précédemment. Une première partie des filtres a été utilisée pour des analyses en MEB au CMTC de G-INP à Grenoble. Il n'a malheureusement pas été possible de visualiser les nanoparticules, même sur les filtres de 2000Da. La présence de Cd n'a non plus pu être mise en évidence sur les cellules de *C. metallidurans* CH34 filtrées à  $0.22\mu\text{m}$  (Figure II-10).

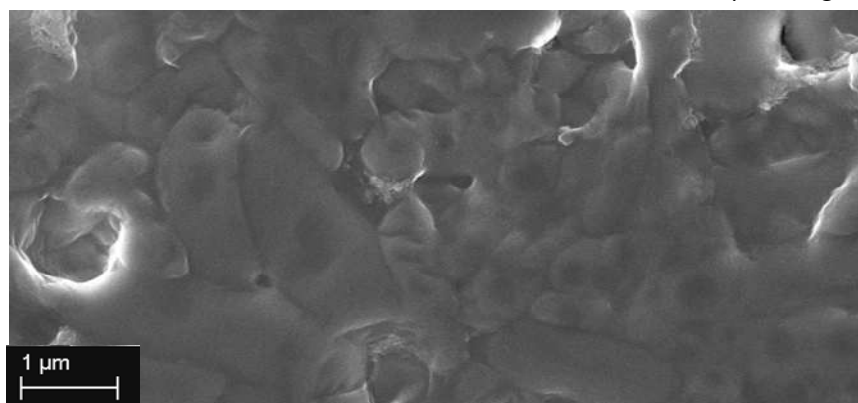


Figure II-10: Cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 sur un filtre de  $0.22\mu\text{m}$  (Sartorius) observées en MEB-FEG (voltage de 5 KV) après culture en présence de cadmium à  $10^{-4}$ M.

Les résultats de quantification directe des métaux dans les différentes fractions de filtration se sont également avérés non exploitables (Tableau II-5). En effet, on note que les filtres retiennent les métaux de manière importante (lot témoin) indiquant une forte sorption du Cd sur les filtres. De plus on note que les résultats ne sont pas reproductibles d'un filtre à l'autre et par duplicat. Ce protocole de visualisation et de quantification directe des nanoparticules de Cd n'est donc pas concluant et doit donc être amélioré.

**Tableau II-5: Résultats des dosages de Cd (en µg) dans les filtres d'ultrafiltration après digestion et extraction à l'eau régale.**

Echantillon	Filtre	µg de Cd retenu
<i>C. metallidurans</i> CH34+ Cd 10 <sup>-4</sup> M	100000 Da	1.39 ± 0.79
	5000 Da	1.12 ± 0.25
	2000 Da	1.41 ± 0.02
<i>E.coli</i> K12Dh5α + Cd 10 <sup>-4</sup> M	100000 Da	1.51
	5000 Da	2.51
	2000 Da	1.49
Témoin (Cd 10 <sup>-4</sup> M)	100000 Da	2.46
	5000 Da	2.07
	2000 Da	1.92

### II-3-2. Caractérisation de la distribution subcellulaire des métaux par fractionnement chimique à l'EDTA

Afin de quantifier la part de métaux biosorbés qui est retenue au niveau de la paroi des bactéries, nous avons appliqué deux techniques de fractionnement différentes. La première est le « fractionnement chimique » du zinc et du cadmium par lequel nous cherchons à extraire spécifiquement les métaux sorbés sur les parois cellulaires à l'aide de ligands ayant une affinité pour les métaux plus forte que celles des sites des surfaces bactériennes. La seconde technique est une méthode physique consistant à casser les cellules à haute pression puis à séparer les compartiments subcellulaires par ultracentrifugations et à y doser spécifiquement les métaux retenus. Ces deux techniques ont été appliquées dans ce chapitre uniquement aux cellules de *C. metallidurans* CH34 afin de valider la méthode qui sera la mieux adaptée pour l'étude de la distribution subcellulaire des métaux dans les cellules des deux bactéries modèles actives et inactives (Chapitre III).

#### II-3-2-1. Distribution subcellulaire du zinc et du cadmium dans les deux bactéries modèles après fractionnement chimique

L'utilisation de ligands fort pour extraire des cations censés être retenus sur les membranes cellulaires a déjà été souvent utilisé (Hassler et al., 2004). L'acide EthylèneDiamineTétraAcétique (EDTA) a été décrit comme le ligand le plus adapté pour cela. C'est donc ce composé que nous avons appliqué dans notre étude en prenant soin, toutefois, de considérer les inconvénients qu'il présente et qui ont déjà été bien documentés. Ainsi, l'EDTA induit la libération du contenu de l'espace périplasmique des cellules vers le milieu extérieur (Vaara, 1992). De plus il peut déstabiliser la membrane interne des bactéries à Gram- en chélatant les cations divalents, qui contribuent au maintien de la cohésion de la couche de lipopolysaccharides (Leive, 1965), et, de ce fait, permettre le relargage de métaux initialement piégés dans le cytoplasme cellulaire (Mirimanoff & Wilkinson 2000; Smiejan et



al. 2003; Hassler et al. 2004; Pabst et al. 2010). Nous avons donc dû mettre au point des conditions opératoires optimales pour nos objectifs spécifiques (concentration en ligand, temps de contact, composition du milieu réactionnel, ...). Ainsi, les conditions optimales que nous avons déterminées sont : une concentration d'EDTA de  $10^{-2}\text{M}$ , un temps de contact avec les cellules le plus court possible après avoir testé des temps de 1, 2, 5 et 10 minutes.

Les quantités de métal, en  $\mu\text{g}$ , mesurées dans chaque compartiment subcellulaire après fractionnement chimique sont présentées dans le Tableau II-6 pour le Zn et le Tableau II-7 pour le Cd. Les taux de récupération des métaux sont également présentés (bilans de masse). D'une façon générale, plus de 95% de la quantité de métal initiale est retrouvée en fin d'expérience montrant, ce qui permet de valider notre démarche expérimentale.

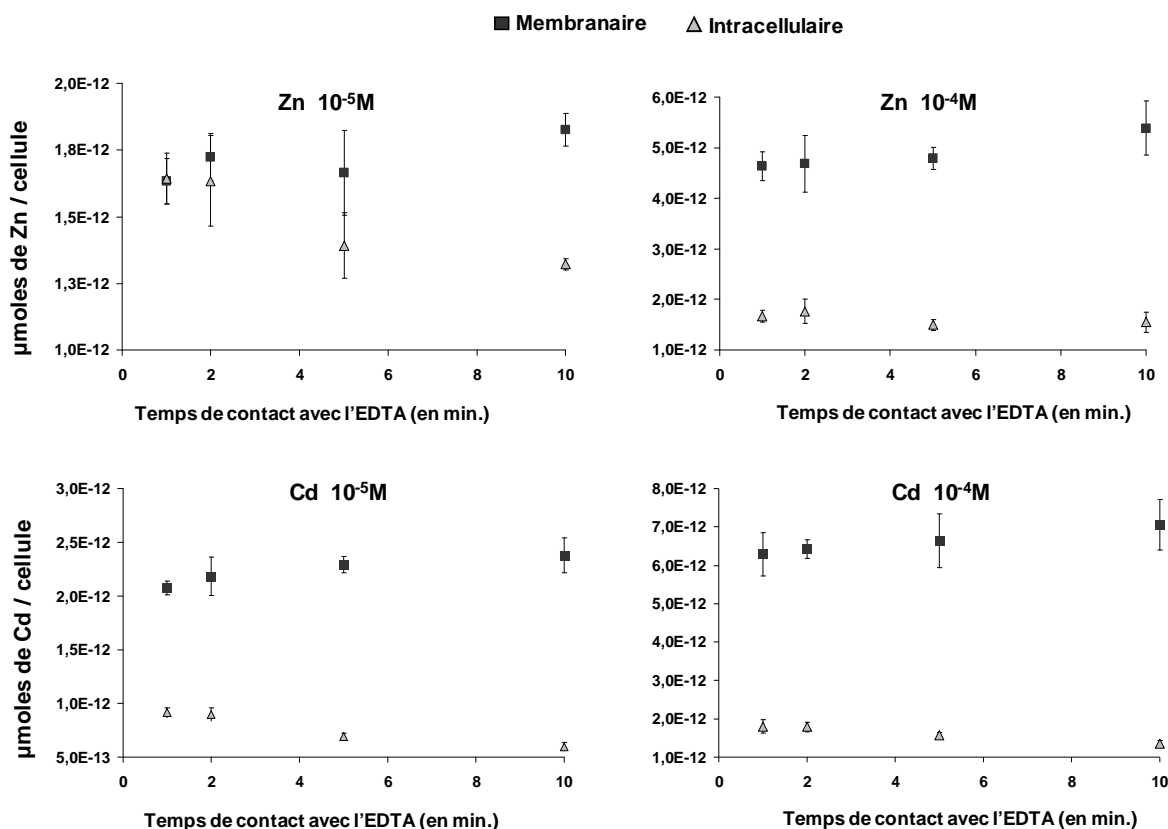
Tableau II-6: Distribution subcellulaire du zinc dans les cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34, mesurée après fractionnement chimique à l'EDTA. Les données sont en µg de Zn par compartiment (± 1'écart type calculé avec des triplicats).

Concentration initiale de Zn		$10^{-5}\text{M}$				$10^{-4}\text{M}$			
Temps de contact avec l'EDTA (min)		1	2	5	10	1	2	5	10
Compartiment	Masse de Zn initiale (µg)	11.8	11.9	11.8	11.8	101.1	99.5	99.5	99.6
	Extracellulaire	8.96 (± 0.38)	8.91 (± 0.15)	9.12 (± 0.30)	8.76 (± 0.34)	93.7 (± 2.15)	91.9 (± 1.56)	92.3 (± 1.13)	91.8 (± 3.62)
	Membrane	1.21 (± 0.02)	1.25 (± 0.07)	1.25 (± 0.06)	1.31 (± 0.09)	3.40 (± 0.16)	3.42 (± 0.30)	3.27 (± 0.24)	3.69 (± 0.14)
	Intracellulaire	1.22 (± 0.02)	1.19 (± 0.13)	1.05 (± 0.04)	1.09 (± 0.27)	1.14 (± 0.04)	1.21 (± 0.10)	1.04 (± 0.01)	1.06 (± 0.06)
	% Récupération de Zn	96.5	95.0	96.5	94.9	97.2	97.0	97.1	96.9

Tableau II-7: Distribution subcellulaire du cadmium dans les cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 mesurée après fractionnement chimique à l'EDTA. Les données sont en µg de Cd par compartiment (± 1'écart type calculé avec les triplicats).

Concentration initiale de Cd		$10^{-5}\text{M}$				$10^{-4}\text{M}$			
Temps de contact avec l'EDTA (min)		1	2	5	10	1	2	5	10
Compartiment	Masse de Cd initiale (µg)	19.8	20.0	20.2	19.9	174.3	175.0	173.1	176.5
	Extracellulaire	15.13 (± 0.34)	15.38 (± 0.30)	15.46 (± 0.41)	15.37 (± 0.47)	159.3 (± 6.48)	159.4 (± 8.29)	158.6 (± 4.90)	161.3 (± 7.87)
	Membrane	2.51 (± 0.08)	2.62 (± 0.10)	2.82 (± 0.09)	2.86 (± 0.11)	7.15 (± 0.12)	6.61 (± 0.40)	7.47 (± 0.54)	7.49 (± 0.56)
	Intracellulaire	1.11 (± 0.04)	1.08 (± 0.05)	0.86 (± 0.02)	0.72 (± 0.04)	1.93 (± 0.25)	1.99 (± 0.11)	1.67 (± 0.03)	1.52 (± 0.07)
	% Récupération de Cd	94.5	95.3	94.7	95.0	96.6	96.0	96.9	96.5

Les résultats de l'effet du temps de contact initial des cellules avec l'EDTA sur les distributions subcellulaires du zinc et du cadmium mesurées sont présentés sur la Figure II-11.



**Figure II-11:** Evolution des quantités mesurées de Zn et de Cd associées aux membranes et au cytoplasme de cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 exposées à  $10^{-5}\text{M}$  et  $10^{-4}\text{M}$  de Zn ou de Cd en fonction du temps de contact initial avec l'EDTA. Les barres d'erreur sont calculées avec des triplicats.

La Figure II-11 montre que le compartiment membranaire contient 2 à 3 fois plus de métaux que le cytoplasme des cellules. Toutefois, on observe que plus le temps de contact entre les cellules et l'EDTA augmente, plus les quantités de Zn ou de Cd dans le compartiment intracellulaire (non extraites à l'EDTA) diminuent quelle que soit la concentration testée. En parallèle, on remarque une augmentation du métal adsorbé aux parois cellulaires (extrait par l'EDTA). Ces résultats indiquent que l'EDTA complexe le zinc et le cadmium biosorbés sur les membranes, mais semble aussi provoquer l'extraction rapide des métaux initialement contenus dans le compartiment intracellulaire. Cet effet est visible même après seulement 2 min. de contact avec les cellules. On observe par ailleurs pour les deux métaux, un effet concentration important : les quantités de Zn et Cd biosorbées sont bien plus importantes à  $10^{-4}$  qu'à  $10^{-5}$  M, en accord avec une isotherme de sorption non linéaire (Guiné 2006). On note toutefois que la distribution globale des métaux entre les deux compartiments cellulaires testés n'est pas modifiée par une augmentation de concentration, le compartiment membranaire restant le plus riche en métaux.

Nous avons comparé les isothermes de sorption obtenus par Guiné et al. (2006, 2007) avec la même bactérie avec nos résultats de biosorption de Cd et Zn par *C. metallidurans* CH34, en considérant la somme des quantités de Zn ou de Cd extraites par l'EDTA (1 minute de contact) et celles restant dans les cellules, comme le total bioaccumulé par les cellules (Figure II-12). On note que les résultats obtenus sont relativement cohérents avec les

isothermes concernant le total bioaccumulé avec tout de même des différences pour la plus forte concentration.

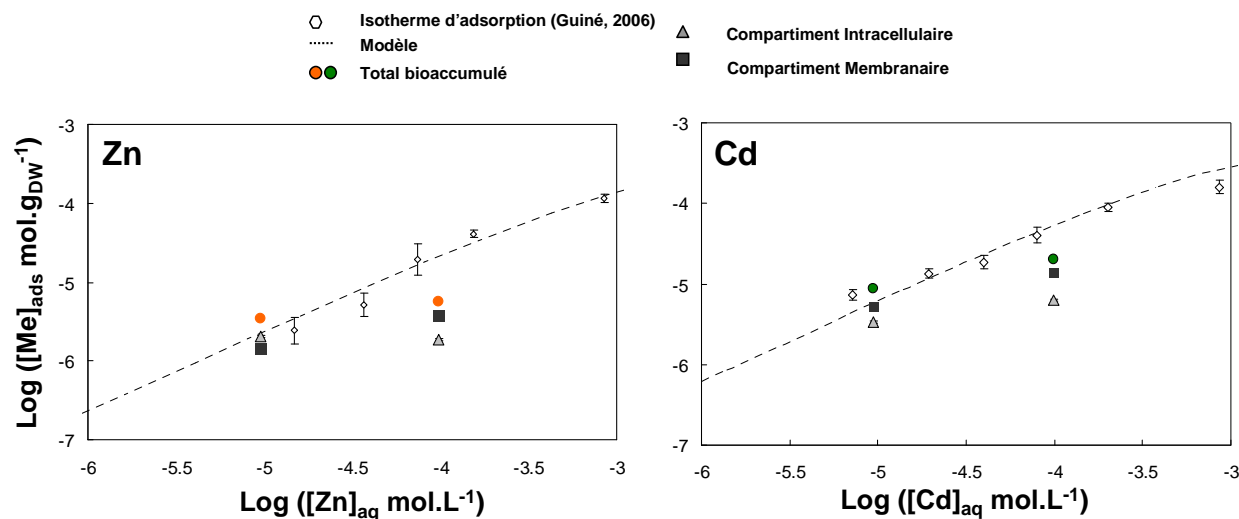


Figure II-12 : Isothermes de sorption de Zn et Cd sur les cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34.

### II-3-3. Caractérisation de la distribution subcellulaire des métaux par fractionnement physique des cellules bactériennes

#### II-3-3-1. Validation du protocole expérimental en MET

Afin de valider l'efficacité de la casse cellulaire par la presse de French, des observations du compartiment membranaire *Cupriavidus metallidurans* CH34 ont été réalisées en MET au CERMAV à Grenoble (Figure II-13). La Figure II-13-A montre des fragments de membranes de *C. metallidurans* CH34 obtenus après la casse cellulaire à la presse de French, en absence de Cd. On observe des gros et des petits fragments de membranes qui ont tendance à se refermer sur eux-mêmes, après s'être vidés de leur contenu cytoplasmique.

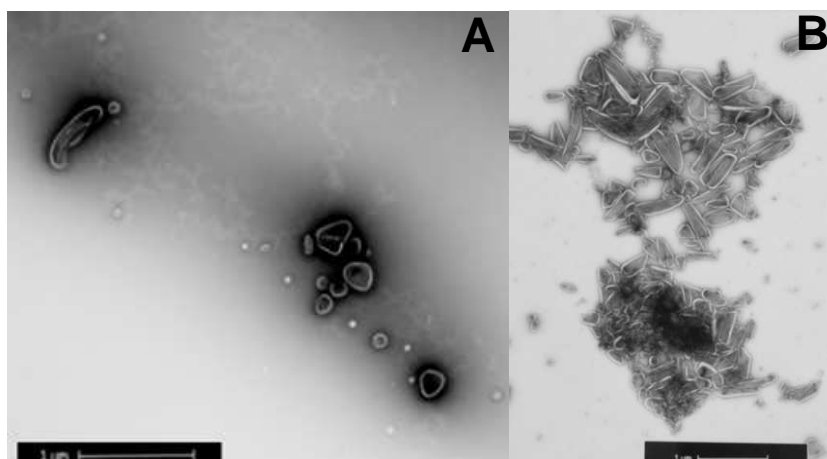


Figure II-13: Observation du compartiment membranaire de cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 non exposées (A) et exposées (B) à  $10^{-4}$  M de Cd, obtenues par casse cellulaire à la presse de French et ultracentrifugation à 20'000g. Les cellules sont observées en coloration négative en MET.

Lorsque les cellules de *C. metallidurans* CH34 sont exposées au Cd ( $10^{-4}$ M), les fragments de membranes obtenus après casse cellulaire (La Figure II-13-B) présentent une forte agrégation, comme si le Cd, cation bivalent, jouait le rôle de flocculant. N'étant pas équipé de système d'analyse spectroscopique X, le MEB utilisé au CERMAV n'a pas permis de vérifier la présence de Cd dans les agrégats de membrane. Il a toutefois permis de vérifier l'efficacité de la casse cellulaire puisque toutes les cellules observées étaient effectivement aplaties et ouvertes, et des cellules intactes n'ont pas été observées puisqu'elles étaient éliminées par centrifugation à faible vitesse (Cf protocole). Par ailleurs, aucun fragment membranaire n'a été observé dans les autres compartiments subcellulaires observés (extracellulaire et intracellulaire) en MET montrant ainsi l'efficacité de notre protocole de séparation des compartiments subcellulaires.

### II-3-3-2. Distribution subcellulaire du cadmium et du zinc chez *Cupriavidus metallidurans* CH34

Les quantités de Cd et de Zn (en  $\mu\text{g}$ ) mesurées dans chaque compartiment subcellulaire après le fractionnement physique sont présentées dans le Tableau II-8. Les bilans de masse des métaux présentés correspondent aux pourcentages de métaux récupérés dans les 3 compartiments et ne prennent pas en compte les métaux retenus dans le compartiment des cellules non cassées. On remarque que plus de 89% de la quantité de métal initiale est retrouvée en fin d'expérience validant ainsi notre protocole expérimental. On peut expliquer les plus faibles bilans de masse des métaux, par rapport à ceux du fractionnement chimique, par une perte de métaux dans le compartiment de cellules non cassées (métaux non dosés) par la presse de French. Pour valider nos résultats, nous avons préparé des contrôles :

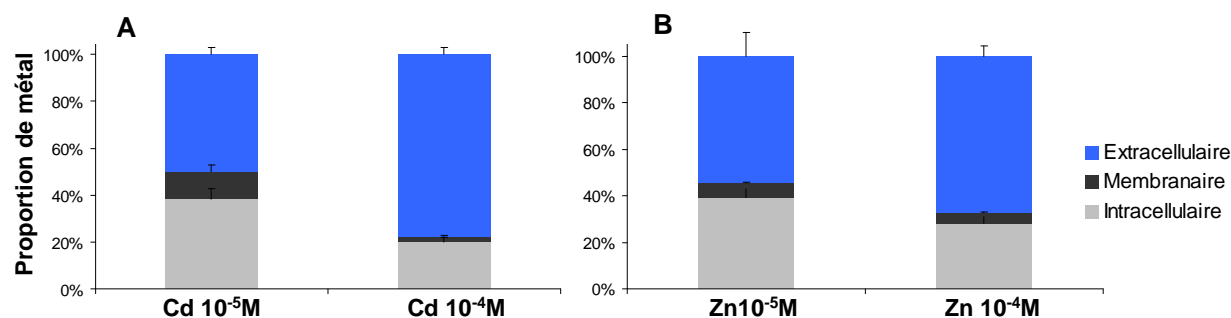
- des métaux sans bactéries
- des bactéries sans métaux
- des blancs sans métaux et sans bactéries

Aucun métal n'a été détecté dans les contrôles sans métal ajouté montrant l'absence de contamination métallique au niveau de l'équipement (presse de French, verrerie...), des consommables et des solutions (acide, eau...) utilisés. De même le taux recouvrement du métal initial en absence de cellules était toujours très proche de 100 %, on peut donc en déduire qu'il n'y a pas de sorption significative de métal sur la verrerie utilisée.

**Tableau II-8: Distribution subcellulaire du cadmium et du zinc dans les cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 après fractionnement physique des cellules. Les données sont présentées en  $\mu\text{g}$  de Cd et de Zn par compartiment ( $\pm 1$  écart type calculé avec des triplicats).**

		Cadmium		Zinc	
Concentration initiale		$10^{-5}$ M	$10^{-4}$ M	$10^{-5}$ M	$10^{-4}$ M
Masse initiale de métal ( $\mu\text{g}$ )		13.80	179.1	10.43	95.02
Compartiment	Extracellulaire	6.14 ( $\pm 0.35$ )	132.94 ( $\pm 4.98$ )	5.2 ( $\pm 0.98$ )	60.23 ( $\pm 4.04$ )
	Membranaire	1.48 ( $\pm 0.36$ )	4.25 ( $\pm 1.01$ )	0.61 ( $\pm 0.05$ )	4.03 ( $\pm 0.61$ )
	Intracellulaire	4.69 ( $\pm 0.59$ )	34.07 ( $\pm 3.29$ )	3.72 ( $\pm 0.35$ )	24.96 ( $\pm 2.68$ )
Taux de récupération (%)		89.20	95.63	91.37	93.90

Pour une meilleure lisibilité, les résultats de distribution des métaux biosorbés en conditions passives à 4°C du tableau précédant sont présentés sous forme d'histogrammes pour le Cd et le Zn dans la Figure II-14.



**Figure II-14:** Distribution du cadmium (A) et du zinc (B) dans les cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 après 2 heures de contact à 4°C mesurés après fractionnement physique des cellules.

Les résultats obtenus confirment la forte biosorption des métaux par les bactéries, déjà observée par fractionnement chimique. Les proportions relatives de Cd et de Zn bioaccumulées par les cellules sont plus importantes à faible concentration ( $10^{-5} M$ ). Le taux de biosorption varie de 21 à 50% du cadmium total. A plus forte concentration la proportion relative de métal biosorbé diminue, bien que la quantité totale de métal biosorbé soit plus élevée (Tableau II-8). Ces résultats confirment également la non linéarité du processus de biosorption du cadmium et du zinc en accord avec les isothermes de sorption de type Langmuir (Figure II-15). De manière surprenante et originale, les résultats de distribution subcellulaire des métaux sont en désaccord avec ceux obtenus de manière indirecte (extraction spécifique à l'EDTA). En effet, avec cette procédure directe de mesure de la distribution des métaux, il apparaît clairement que les métaux sont majoritairement internalisés dans le cytoplasme cellulaire : de 76% à 88% pour le Cd et de 86% à 87% pour le zinc, apportés respectivement à  $10^{-5}$  et  $10^{-4} M$ .

### II-3-3-3. Comparaison aux isothermes de sorption

Les résultats précédents ont été reportés sur les isothermes de sorption obtenus par Guiné et al. (2006, 2007) en considérant la somme de métal dans le compartiment membranaire et intracellulaire comme la quantité totale de métal bioaccumulée par les cellules (Figure II-15).

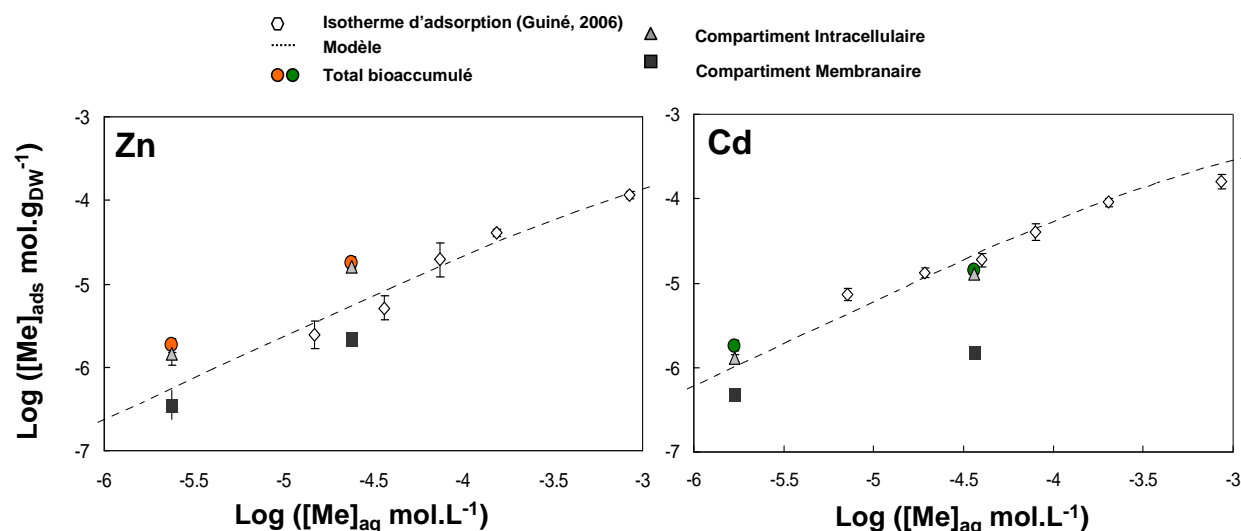


Figure II-15: Isothermes de sorption de Zn et Cd sur les cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34.

On note que les résultats de notre étude sont en assez bonne correspondance avec les isothermes de sorption obtenues par Guiné et al. (2006, 2007), notamment pour le Cd. Pour le Zn, la biosorption globale mesurée sur les cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 est légèrement plus élevée ce qui est prédit par la modélisation de Langmuir.

## II-4. Discussion

### II-4-1. Etude qualitative de la distribution du zinc et du cadmium dans les bactéries modèles

D'une manière générale, les expériences d'observation directe de la distribution subcellulaire des métaux dans les bactéries tendent à montrer que les métaux tels que le Zn ou le Cd sont internalisés dans le cytoplasme des cellules et notamment de *E. coli* K12Dh5a, mais sans toutefois en apporter la preuve irréfutable, comme nous l'avions espéré. Les résultats ne sont donc que qualitatifs, mais en aucun cas quantitatifs. Les analyses en Cryo-MET ont montré un enrichissement en Cd de nanogranules de phosphore naturellement produits par *C. metallidurans* CH34. Ceci suggère que cette bactérie est capable de se protéger de fortes concentrations de Cd en surproduisant des polymères riches en P dans le milieu extracellulaire, capables de complexer le Cd. Ce type de mécanisme de résistance à déjà été montré dans la littérature chez d'autres microorganismes (Keasling et al., 1998; Finlay et al., 1999; Gadd, 2000; Pagès et al., 2007). Les tentatives de caractérisation fine de ces nano-granules après purification en ultrafiltration, n'ont malheureusement pas donné de résultats concluants, indiquant que nos techniques analytiques de mesure n'étaient adaptées à nos objectifs.

L'ensemble de ces résultats mériterait d'être plus approfondis à l'avenir en appliquant des protocoles et outils d'observation plus résolutifs que le MET-EDX, tels que le PIXE ou le nanoSIMS. En apportant encore plus de soin à la préparation des échantillons (préparation extemporanée juste avant l'observation en microscopie comme la CEMOVIS. Ces outils permettraient par ailleurs d'étudier des concentrations faibles en métaux, plus représentatives de celles observées *in situ* dans les milieux naturels.

### II-4-2. Etude quantitative de la distribution du zinc et du cadmium dans les bactéries modèles

Il existe assez peu d'études qui se sont intéressées à la quantification directe de la distribution de métaux chez les bactéries. La plupart de ces études faisaient appel à des approches de fractionnement chimique, notamment avec de l'EDTA pour établir des cinétiques d'adsorption de métaux sur les bactéries (Mirimanoff & Wilkinson 2000; Smiejan et al. 2003; Hassler et al. 2004; Pabst et al. 2010). C'est la raison pour laquelle nous avons voulu appliquer cette méthode à notre problématique. Toutefois, compte tenu des très nombreux inconvénients liés à cette méthodologie, nous avons préféré mener en parallèle la même étude avec une autre technique, largement utilisée en biologie cellulaire pour des études de compartimentation de protéine, de composés organiques ou de polysaccharides. Les deux approches ont donné des résultats tout à fait différents, l'une montrant une plus forte rétention des métaux sur les membranes et l'autre (plus fiable) montrant, de manière originale, une forte internalisation des métaux dans le compartiment cytoplasmique bactérien.

Nos résultats obtenus avec le fractionnement chimique ont confirmé la forte dépendance des résultats aux conditions expérimentales, et notamment au temps de contact de l'EDTA avec les cellules mais aussi à la concentration en EDTA (tests préliminaires), rendant ainsi les résultats obtenus difficilement transposables à d'autres conditions et comparables avec d'autres études (Smiejan et al. 2003, Hassler et al., 2004). Les résultats obtenus sont en accord avec le fait que l'EDTA est connu pour perforer les membranes et donc conduire à un relargage d'une partie du contenu intracellulaire (Vaara, 1992). Une seule étude de fractionnement chimique menée avec des conditions opératoires très proches des nôtres sur du Cd biosorbé (extrait à l'EDTA) par *Sinorhizobium meliloti* (Slaveykova et al. 2009) a montré des résultats de distribution subcellulaires proches de ceux obtenus dans notre étude (Tableau II-9). Bien que ces différences de mode opératoire rendent relativement difficile la comparaison de nos résultats avec la littérature, on a pu quand même observer globalement des quantités de Cd adsorbées proches des nôtres. D'une manière générale, les études faisant appel à du fractionnement chimique montrent donc une plus forte rétention des métaux au niveau des membranes qu'au niveau du cytoplasme cellulaire. La forte dépendance des résultats au temps de contact cellules/EDTA indique que très probablement une quantité significative de métaux attribuée au compartiment membranaire provient en réalité du cytoplasme et a été artificiellement extraite par l'EDTA, qui est un très fort complexant organique et qui peut en plus conduire à une lyse cellulaire plus ou moins rapide dont la conséquence est bien entendu, le relargage de métaux vers le milieu extracellulaire.

Dans ces conditions, nous pouvons donc difficilement avoir une confiance totale dans ces résultats, qui restent donc très hypothétiques, d'autant plus que les équilibres chimiques avec l'EDTA se font rapidement, mais que le temps de contact ne peut pas être diminué suffisamment pour limiter entièrement des redistributions de métaux car le temps de centrifugation après la mise en contact avec EDTA ne peut pas être réduit. Nos résultats confirment donc la difficulté d'interprétation de ce type d'approche, telle que cela a déjà été souvent montrée, pointant en particulier que ces techniques d'extraction spécifique donnent des résultats conditions-dépendants non transposables.



**Tableau II-9 : Distribution subcellulaire du Cd dans des bactéries à Gram- pour 2 concentrations initiales différentes, mesurée par fractionnement chimique à l'EDTA ( $10^{-2}$ M et 1 minute de contact).**

Bactérie et étude	<i>R. rubrum</i> S1 (Smiejan et al. 2003)	<i>S. meliloti</i> (Slaveykova et al. 2009)	<i>C. metallidurans</i> (cette étude)	<i>S. meliloti</i> (Slaveykova et al. 2009)	<i>C. metallidurans</i> (cette étude)
[Cd <sup>2+</sup> ] initiale (M)	$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$
Cd membranaire complexé par l'EDTA (mol/cm <sup>2</sup> )	$< 6 \cdot 10^{-12}$	$1 \cdot 10^{-11}$	$1.1 \cdot 10^{-12}$	$8 \cdot 10^{-11}$	$3.3 \cdot 10^{-12}$
Cd intracellulaire non complexé par l'EDTA (mol/cm <sup>2</sup> )	$< 1 \cdot 10^{-12}$	$1 \cdot 10^{-12}$	$7.2 \cdot 10^{-13}$	$5 \cdot 10^{-12}$	$1.5 \cdot 10^{-13}$

Les résultats de distribution subcellulaire des métaux obtenus avec une méthode de fractionnement physique des cellules, qui a déjà largement fait ses preuves en biologie cellulaire, nous semblent beaucoup plus fiables que ceux du fractionnement chimique. En effet, cette approche permet de s'affranchir de la présence de ligands et des problèmes liés aux conditions expérimentales. Cette méthode déjà largement validée permet par ailleurs d'obtenir des résultats très reproductibles. Ces résultats ont montré ainsi, de manière originale, que les métaux biosorbés de manière passive par les deux bactéries modèles à Gram- (inactivées à 4°C) sont principalement internalisés dans le cytoplasme (>80% du métal bioaccumulé). Ces résultats surprenants sont en accord avec les conclusions de Guiné et al. (2006), qui ont montré que la densité de sites réactifs théorique des membranes cellulaires ne permet pas d'expliquer la réactivité globale des bactéries telle que mesurée expérimentalement et qui est très proche pour à peu près toutes les bactéries, qu'elles soient à Gram+ ou à Gram- (Yee et Fein, 2001; Ngwenya et al., 2003). Nos résultats sont donc plutôt en désaccord avec les concepts classiques qui considèrent la membrane cellulaire comme le principal acteur de la biosorption des métaux (Fein et al., 1997; Cox et al., 1999; Yee and Fein, 2001; Guiné et al., 2006) avec la prise en compte très conceptuelle de seulement 3 ou 4 sites réactifs membranaires. Toutefois, nos résultats sont en accord avec certaines études sur des algues microscopiques qui accumulent principalement le Cd de manière intracellulaire (Matsunaga, 1999; Pérez-Rama et al., 2002), mais surtout avec l'étude de Guiné et al. (2006) qui ont montré que compte tenu de la réactivité théorique des membranes (en fonction de leur composition réelle), d'autres compartiments cellulaires, tels que le cytoplasme ou les EPS liés, doivent retenir une grande majorité des métaux biosorbés, et ce dans un rapport de 10 à 30 avec les membranes. Dans notre étude, nous obtenons des rapports de 4 à 10 pour les quantités de Zn et de Cd accumulées entre les compartiments interne et membranaire suivant la concentration en métaux étudiée, ce qui est tout à fait plausible avec les quantités totales biosorbées, tel que nous l'avons montré dans les figures II-12 et II-15. Ces résultats confirment donc de manière directe les résultats qualitatifs obtenus par visualisation en MET-EDX de la distribution subcellulaire des métaux dans les bactéries.

## II-5. Conclusion

Ce premier chapitre a permis de présenter tout d'abord les différents modèles bactériens et métalliques étudiés ainsi que leurs principales caractéristiques. L'un des objectifs de cette thèse étant de mieux comprendre la prise en charge du Zn et du Cd par ces 2 bactéries modèles au niveau subcellulaire, nous avons développé ou adapté des approches expérimentales permettant notamment de quantifier la distribution des métaux à l'échelle subcellulaire afin de contribuer à l'identification des mécanismes de prise en charge des métaux par les bactéries en conditions fortement ou faiblement polluées.

Dans un premier temps, des analyses qualitatives ont été réalisées par microscopie électronique afin d'essayer de visualiser directement les compartiments cellulaires où les métaux s'accumulent préférentiellement. Ces analyses effectuées en MET-EDX et en CryoMET, nous ont permis de confirmer certaines hypothèses formulées par Guiné (2006), à savoir que les métaux pouvaient être fortement internalisés sous certaines conditions et conduire à de fortes accumulations intracellulaires notamment du Zn dans les cellules de *E. coli* K12Dh5a. L'utilisation de la CryoMET s'est avérée intéressante et a permis de montrer la présence de polymères riches en phosphore qui peuvent s'enrichir en cadmium dans l'environnement extracellulaire de cellules actives de *C. metallidurans* CH34. Nous avons été confrontés aux limites de ces approches visuelles, puisque ce sont souvent des méthodes semi-quantitatives et relativement peu sensibles, rendant difficiles les études aux concentrations faibles classiquement rencontrées dans l'environnement, et nécessitant l'utilisation de produits chimiques (contrastants, résines...) ou de conditions physiques (température, vide...) pouvant induire des artefacts qui modifient l'état original des objets.

Malgré cela, ces résultats, plutôt surprenants, de bioaccumulation préférentielle (>80%) des deux métaux modèles dans le cytoplasme cellulaire au détriment des membranes, même en conditions d'inactivité cellulaire (4°C), ont été confirmés par une approche de fractionnement physique (casse des cellules à haute pression) et mesure directe des teneurs en métaux dans les différents compartiments subcellulaires par ICP-MS, mais pas par une approche de fractionnement chimique basé sur l'extraction sélective des métaux retenus sur les membranes par un ligand organique fort, l'EDTA. Cette dernière méthode s'avère trop sensible aux conditions opératoires et entraîne le plus souvent une altération des cellules qui diminue la fiabilité des résultats ainsi obtenus.

Les résultats obtenus avec le recours à une méthode de fractionnement cellulaire déjà largement validée par ailleurs, sont en accord avec des études récentes, qui ont remis en question la conceptualisation classique qui considère la membrane cellulaire comme le principal acteur de la biosorption des métaux, avec de manière simplifiée, 3 ou 4 sites réactifs impliqués dans cette réactivité. Dans une étude récente (Guiné et al., 2006), des calculs de réactivité théorique des différents constituants membranaires des bactéries à Gram- ont montré que l'adsorption des métaux sur les membranes bactériennes ne pouvait pas expliquer plus de 4 à 10% de la biosorption globale des métaux par les bactéries. Nos résultats sont donc en accord avec cette étude et constituent une des premières preuves expérimentales de la forte contribution du compartiment interne des cellules bactériennes à la bioaccumulation de métaux lourds tels que le zinc et le cadmium.

Ce chapitre a donc permis, dans un premier temps, de visualiser la rétention subcellulaire des métaux dans par *E. coli* et également de montrer, même si cela reste à confirmer, que *C. metallidurans* semble capable de surproduire de polymères extracellulaires riches en phosphore pour y capturer le cadmium en excès dans son environnement. Ce dernier point n'a pas pu être validé dans notre étude et reste donc une perspective importante de notre

travail. Le premier point en revanche a été confirmé par une mesure directe des concentrations de métaux retenus dans les 3 compartiments subcellulaires, par une approche de fractionnement physique des bactéries exposées aux métaux à des concentrations variables.

**CHAPITRE III    Effet de l'état métabolique des cellules  
bactériennes sur l'accumulation et la distribution  
subcellulaire de métaux seuls ou en mélange**



## III-1. Introduction

La plupart des études s'intéressant à l'adsorption des métaux sur la surface des bactéries ont été menées sur des cellules métaboliquement inactives, durant la phase d'adsorption, se focalisant sur des phénomènes de biosorption passive des cations sur les groupements fonctionnels membranaires. Cependant, des bactéries métaboliquement actives sont susceptibles de présenter des propriétés de biosorption différentes de celles des cellules inactives en raison notamment de modifications de mobilité, de spéciation, de biodisponibilité des métaux et de prise en charge active des métaux par les cellules (Johnson et al., 2007; Açikel and Alp, 2009). En effet, chez les bactéries, on considère généralement qu'il existe deux systèmes d'assimilation des métaux (Nies, 1999) :

- un premier processus rapide et non spécifique, utilisé par de nombreux substrats, et constitutif. Ce type de transport cationique est contrôlé par le gradient chimiosmotique à travers la membrane. On parle alors de diffusion simple qui s'explique par des régulations d'équilibre entre les compartiments interne et externe de la cellule, induisant des transferts passifs par des porines.

- un second processus plus lent, inductible, impliquant une forte affinité au substrat et nécessitant souvent un apport énergétique (hydrolyse d'ATP). Ce type de transport est utilisé principalement en cas de carence ou de besoin métabolique spécifique. On parle alors de transport actif impliquant des transporteurs membranaires dont la synthèse et l'activation sont contrôlées au niveau génétique via divers systèmes de gènes.

En conditions passives d'exposition, à 4°C, on considère que les cellules sont métaboliquement inactives et que les phénomènes observés sont pour la majorité dus à des mécanismes passifs (Guiné, 2007). Dans ces conditions, seront mis en jeu les phénomènes d'adsorption passive aux groupements fonctionnels de surface. Concernant l'assimilation des métaux, elle sera due principalement à de la diffusion et non à du transport actif. Avec des cellules actives (30°C), les bactéries vont activer leurs différents systèmes de prise en charge et de résistance aux métaux, tels que les mécanismes d'efflux cellulaire, la surproduction d'EPS, la séquestration intracellulaire pour se protéger de la toxicité des métaux (Malik, 2004). Certaines études ont notamment montré que les quantités de Cd intracellulaire accumulées par des cellules actives de microalgues étaient plus importante que celles retenues sur les membranes (Matsunaga, 1999; Pérez-Rama et al., 2002). Choi and Park (2005) ont montré que les cellules mortes de microorganismes adsorbent plus de métaux que les cellules vivantes actives qui mettent en place des mécanismes pour limiter assimilation.

Le chapitre précédent a permis de montrer que la méthode de fractionnement physique des cellules bactériennes était la plus adaptée pour l'étude de la distribution subcellulaire des métaux chez les bactéries. Les résultats obtenus ont notamment permis de montrer, de manière originale, que même en conditions d'inactivité (4°C), les cellules de *C. metallidurans* CH34 sont capables d'internaliser une grande partie du Cd et du Zn (80%) biosorbé.

D'autre part, nous nous sommes intéressés dans ce chapitre à l'effet des mélanges de métaux sur leur biosorption. En effet, dans les environnements naturels contaminés ou non, les bactéries ont rarement à faire face à un seul polluant, mais plutôt à un « cocktail » de polluants organiques et inorganiques. La plupart des études se sont intéressées aux interactions entre un métal et une bactérie. Seules quelques rares études se sont intéressées à l'effet de la présence d'ions compétiteurs sur la biosorption de métaux lourds chez les microorganismes. Ainsi, Açikel and Alp (2009) ont montré une inhibition de la bioaccumulation du Cu et du Ni en mélange par le champignon, *Rhizopus delemar*, par rapport aux conditions de mono exposition. De même, Choi and Park (2005) ont montré que

l'adsorption de Ni était inhibé par la présence d'autres métaux (U, Pb, Cd et Zn) suggérant que l'assimilation d'un métal peut être significativement réduite en présence d'un autre métal. Tunali et al. (2006) ont montré que la présence de Pb et de Cu en mélange diminue leur adsorption par *Bacillus sp.* par rapport aux cas où les cellules bactériennes sont exposées à un seul métal. Watt and Ludden (1999) ont montré que la présence de Co, Cd et Cu (17 fois en excès par rapport au Ni) inhibe l'accumulation de Nichez *Rhodospirillum rubrum* de 35, 58 et 66% respectivement.

Le zinc étant un oligoélément essentiel au développement des microorganismes, ces derniers possèdent des systèmes de transport spécifiques (paragraphe I-3). En revanche, pour les microorganismes ne possèdent pas de systèmes de transport spécifique du Cd, son entrée dans les cellules se fait par des transporteurs d'oligoéléments essentiels existants, tels que ceux du Ca, Mg, Mn et Zn (Nies, 1999; Haferburg and Kothe, 2007).

Certains auteurs se sont intéressés aux effets de compétition de cations sur la biosorption du Cd et Zn par les bactéries. Slaveykova et al. (2009) ont montré que chez la bactérie à Gram négatif, *Sinorhizobium meliloti* l'adsorption du Cd était principalement affectée par le Ca et le Mg, alors que l'assimilation du Cd au niveau intracellulaire était dépendante de la présence de Ca et de Zn dans la solution. Dans une autre étude, Plette et al. (1996) ont montré que la présence de Zn diminue la biosorption de Cd par la bactérie à Gram positif, *Rhodococcus erthropolis* A177. Toutefois dans cette étude la concentration de Zn était 100 fois supérieure à celle de Cd.

Dans ce chapitre, nous avons appliqué la méthodologie développée dans le chapitre II, à l'étude de la biosorption du Cd et du Zn par nos deux bactéries modèles, mais en conditions plus réalistes et plus représentatives des conditions naturelles, c'est-à-dire avec des cellules actives (en comparaison avec des cellules inactives), et avec un mélange des deux métaux lourds. Cette méthodologie va nous permettre de comparer la distribution subcellulaire du zinc et du cadmium chez deux bactéries de sensibilité différente aux métaux, *Cupriavidus metallidurans* CH34 et *Escherichia coli* K12DH5 $\alpha$ . Différentes conditions expérimentales ont été testées afin d'étudier l'effet de la concentration métallique sur la distribution des métaux dans les deux souches. L'effet de l'état physiologique des cellules, actives (30°C) ou inactives (4°C), sur la sorption et l'internalisation du Cd et du Zn sera également prise en compte. Nous proposons également d'étudier l'effet du mélange zinc et cadmium sur leur distribution subcellulaire dans les cellules bactériennes modèles et en fonction de l'état physiologique des bactéries.

## **III-2. Matériel et méthodes**

### **III-2-1. Les modèles bactériens**

Les 2 modèles bactériens utilisées lors de ces expériences sont *Cupriavidus metallidurans* CH34 et *Escherichia coli* K12DH5 $\alpha$  et ont déjà été décrites dans le paragraphe II-2-2. Pour leur culture, des aliquots de suspensions cellulaires stockées avec du glycérol 32% à -80°C sont utilisés pour inoculer deux milieux de cultures minéraux à pH6 : le Tris Salt Medium (TSM) complété avec 2 g L<sup>-1</sup> de gluconate pour *C. metallidurans* CH34 et le milieu M9 complété avec 5 g L<sup>-1</sup> de glucose pour *E. coli* K12DH5 $\alpha$ . Les bactéries sont cultivées à 30°C sous agitation à 150 rpm (incubateur agité Infors). Les cellules sont récoltées en fin de phase exponentielle de croissance (DO<sub>600</sub> = 2.2  $\pm$  0.2) et concentrées par centrifugation à 5000g pendant 10 minutes. Afin de normaliser les résultats, les concentrations bactériennes finales sont fixées à 1 g.L<sup>-1</sup>  $\pm$  0.1 pour toutes les expériences à suivre dans ce chapitre.

### III-2-2. Mode d'exposition des bactéries aux métaux

Pour l'étude de la distribution des métaux, seuls ou en mélange, deux conditions d'exposition de bactéries aux métaux ont été testées :

**Exposition aux métaux sous conditions passives:** un premier mode d'exposition a été testé, il correspond à des conditions passives d'exposition des cellules bactériennes aux métaux modèles, pendant 2 heures à 4°C, comme décrit dans le paragraphe II-2-3.

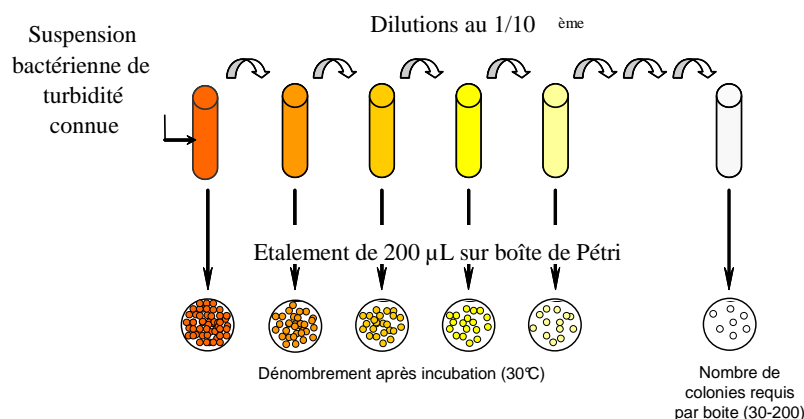
**Exposition aux métaux sous conditions actives:** les cellules sont exposées aux métaux pendant toute leur phase de croissance dans les milieux de culture contaminés avec le zinc et le cadmium à 0,  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$  M. En fin de phase exponentielle (entre 30 et 48 heures), des aliquots de suspensions sont centrifugés 10 min à 5000 g, et concentrés afin d'obtenir des échantillons de 20 mL à une concentration bactérienne finale de  $1\text{g.L}^{-1}$ . Le surnageant, que l'on appellera le compartiment extracellulaire, est stocké à -20°C avant analyse. Les culots bactériens sont alors traités pour obtenir les deux compartiments subcellulaires bactériens comme décrit ci-après

Pour les tests avec les mélanges de métaux, seule la concentration de  $10^{-5}\text{M}$  a été testée pour limiter la toxicité qui s'est avérée trop importante pour *E. coli* K12DH5 $\alpha$ .

### III-2-3. Etude de la toxicité du zinc et du cadmium sur les deux bactéries modèles

Les effets toxiques du zinc et du cadmium sur les 2 souches ont été étudiés par le suivi des courbes de croissance des bactéries en milieu minéral. Les cellules sont préalablement cultivées en milieu riche LB pendant 12h puis, après rinçage à l'eau distillée, un aliquot de cette culture est utilisé pour inoculer les milieux minéraux (TSM ou M9) contaminés avec du Zn et/ou du Cd à 0,  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$  M. Des prélèvements réguliers de suspension sont effectués au cours de la croissance bactérienne pour le suivi de la concentration cellulaire (toutes les heures). La croissance bactérienne est suivie par lecture de la turbidité des suspensions bactériennes à 600 nm ( $\text{DO}_{600}$  pour densité optique à 600 nm), à l'aide un spectrophotomètre (Luminescence Spectrometer LS55 - Perkin Elmer). Une relation linéaire entre la  $\text{DO}_{600}$  et la concentration cellulaire a été établie préalablement pour chaque souche et chaque milieu de culture, à partir d'un dénombrement bactérien par culture sur boîte de Petri (Tableau II-3: Caractéristiques morphologiques des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 et *Escherichia coli* K12DH5 $\alpha$  (Guiné, 2006 et cette étude). Un dénombrement sur boîtes de Petri a été effectué seulement pour certains points de la cinétique. Les dénombrements sont effectués par la méthode indirecte de dilution et de culture sur boîte de Petri (Figure III-1). Il s'agit de diluer plusieurs fois d'un facteur 10 la suspension bactérienne et d'étaler, en triplicat, 100  $\mu\text{L}$  de ces dilutions sur des boîtes de Petri de façon à obtenir le développement de 30 à 200 colonies bactériennes par boîte. Après 24 à 48h de croissance à 30°C, les colonies sont dénombrées sur les boîtes et on peut alors déterminer la concentration de la suspension initiale en tenant compte des facteurs de dilution.





**Figure III-1: Schématisation du protocole de dénombrement des bactéries par la méthode de dilution et de culture sur boîtes de Pétri.**

Une énumération des cellules bactériennes par cytométrie en flux (CMF) a également été effectuée. Le laboratoire disposant d'un cytomètre en flux (C6 de Accuri), nous avons pu effectuer un suivi rapide de la croissance cellulaire et également évaluer la toxicité du Zn et du Cd sur les bactéries modèles. Le principe de la CMF est présenté en Annexe 1. En parallèle aux analyses classiques ( $DO_{600}$  et dénombrements sur boîte de Petri), des énumérations cellulaires ont été réalisées par CMF. Cette technique permet en particulier d'étudier la toxicité des métaux en caractérisant la perte de l'intégrité membranaire qui représente un changement important de l'activité de la cellule bactérienne puisque la perte d'intégrité est liée à la mort cellulaire (Maynadié, 2006). L'étude de l'intégrité membranaire est basée sur la capacité des cellules intègres à exclure un marqueur des acides nucléiques, le plus connu et utilisé étant l'iodure de propidium (IP). L'évaluation de l'état physiologique des cellules bactériennes a donc été fait en utilisant le kit Live/Dead® BacLight™ (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Ce kit est composé de 2 fluorochromes (le SYTO 9 et l'Iodure de Propidium, IP) qui sont tous 2 des colorants des acides nucléiques (respectivement vert et rouge). Ces 2 colorants diffèrent quant à leurs propriétés spectrales et leur capacité à pénétrer dans la cellule. En effet, le SYTO 9 diffuse facilement à travers les membranes intactes ou non et marque toutes les bactéries. L'IP pénètre seulement dans les cellules dont la membrane est endommagée. Les cellules possédant une membrane cytoplasmique intacte sont donc capables d'exclure totalement l'IP pour des raisons de taille et de charge (Berney et al., 2007). Dans le cas d'un mélange des 2 colorants, on considère que les cellules vertes sont les cellules intactes (cellules viables) et que les cellules rouges correspondent aux cellules dont la membrane est endommagée (cellules non viables). Les longueurs d'ondes d'excitation/émission sont respectivement de 480/500 nm pour le SYTO 9 et de 490/635 nm pour l'IP.

En pratique, la coloration est réalisée sur 1 mL de culture en ajoutant 1 µL de SYTO 9 et 2 µL d'Iodure de Propidium. Ce mélange est incubé 15 minutes à température ambiante à l'obscurité et ensuite analysée en cytométrie en flux. Un exemple de cytogramme permettant de différencier les cellules mortes et vivantes est présenté sur la Figure III-2

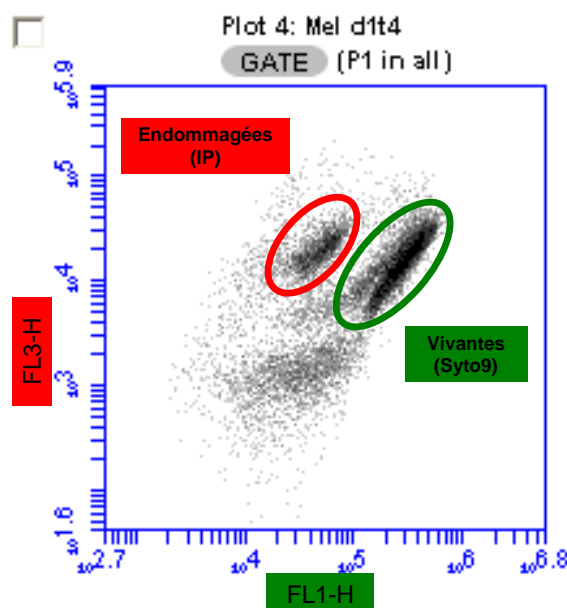


Figure III-2: Exemple de cytogramme FL3-H versus FL1-H de cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 colorées avec le kit Live/Dead® BacLight™ permettant de visualiser et de quantifier les cellules viables marquées au Syto9 et les cellules endommagées marquées à l'Iodure de Propidium (IP).

#### III-2-4. Etude de la distribution subcellulaire des métaux par fractionnement physique (Presse de French)

Les résultats obtenus dans le chapitre II, nous ont permis de valider la méthode de fractionnement physique comme la plus adaptée pour l'étude de la distribution des métaux dans les bactéries à l'échelle subcellulaire. Le protocole est le même que celui présenté dans le paragraphe II-2-6 et permet, après une casse physique des cellules (presse de French) et leur ultracentrifugation, de différencier trois compartiments subcellulaires : **extracellulaire**, **membranaire** et **intracellulaire**.

#### III-2-5. Dosages biochimiques des sucres et des protéines

Des analyses des sucres et des protéines totaux ont été menées en fin de phase exponentielle de croissance des bactéries en conditions d'exposition active aux métaux. Le but est d'étudier la surproduction de sucres et de protéines par les cellules en réponse à la présence de métal dans le milieu en relation avec un éventuel mécanisme de résistance. Nous avons quantifié séparément les protéines et les sucres totaux au niveau des cellules mais également dans le milieu extracellulaire. Pour cela les cellules sont séparées du milieu extracellulaire par centrifugation (5000 rpm, 15 minutes à 4°C) avant dosage biochimique dans le surnageant (milieu extracellulaire) et le culot (protéines et sucres associés aux cellules). Le dosage de protéines a été effectué selon le protocole de Folin-Lowry (Lowry et al., 1951), les sucres (carbohydrates) étant dosés par la méthode phénol - acide sulfurique selon le protocole de (Masuko et al., 2005). Ces protocoles sont présentés en Annexes 2 et 3.

### III-3. Résultats

#### III-3-1. Effet des métaux sur la croissance bactérienne

##### III-3-1-1. Calibration des différentes méthodes analytiques

Afin de valider notre procédure d'énumération cellulaire bactérienne par CMF, des tests de calibration des 3 méthodes de mesure de concentrations cellulaires ont été effectués sur différents échantillons de concentration cellulaire croissante. Les résultats sont présentés sur la Figure III-3.

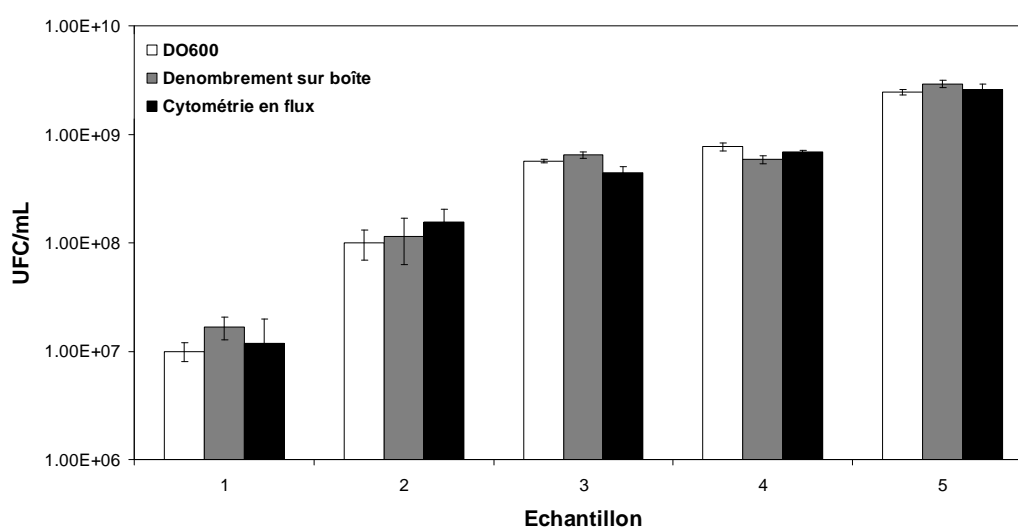


Figure III-3 : Dénombrements cellulaires (cellules par mL) d'échantillons de concentration cellulaire croissante obtenus par mesure de la turbidité ( $DO_{600}$ ), culture sur boîte ou cytométrie en flux.

La Figure III-3 montre que les trois techniques donnent des résultats très proches, avec quelques petites différences pour certains échantillons, notamment aux faibles concentrations. L'utilisation de la cytométrie en flux pour la mesure de concentration cellulaire apparaît donc envisageable avec une précision similaire à celles des autres méthodes et un seuil de détection très faible. En effet, la CMF permet d'analyser des concentrations faibles de microorganismes, notamment grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes. De plus, cette technique permet d'analyser un grand nombre d'échantillons de manière rapide et automatisée grâce à un passeur d'échantillons.

##### III-3-1-2. Suivi de croissance des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34

Les courbes de croissance de *C. metallidurans* CH34 et de *E. coli* K12DH $\alpha$ , en présence ou non de métaux obtenues par suivi de la  $DO_{600}$  sont présentées dans les Figure III-4 et Figure III-5. L'étude des courbes permet de caractériser divers paramètres de croissance, comme le temps de division cellulaire ainsi que le taux de croissance. Ce dernier correspond à la pente de la partie exponentielle de la courbe de croissance, suivant l'équation  $\ln N = f(t)$ . Le temps de division cellulaire correspond au temps nécessaire au doublement de

la population (en minutes). Ces deux paramètres sont potentiellement affectés par la présence des métaux dans le milieu de croissance et sont utilisés comme indicateur de toxicité.

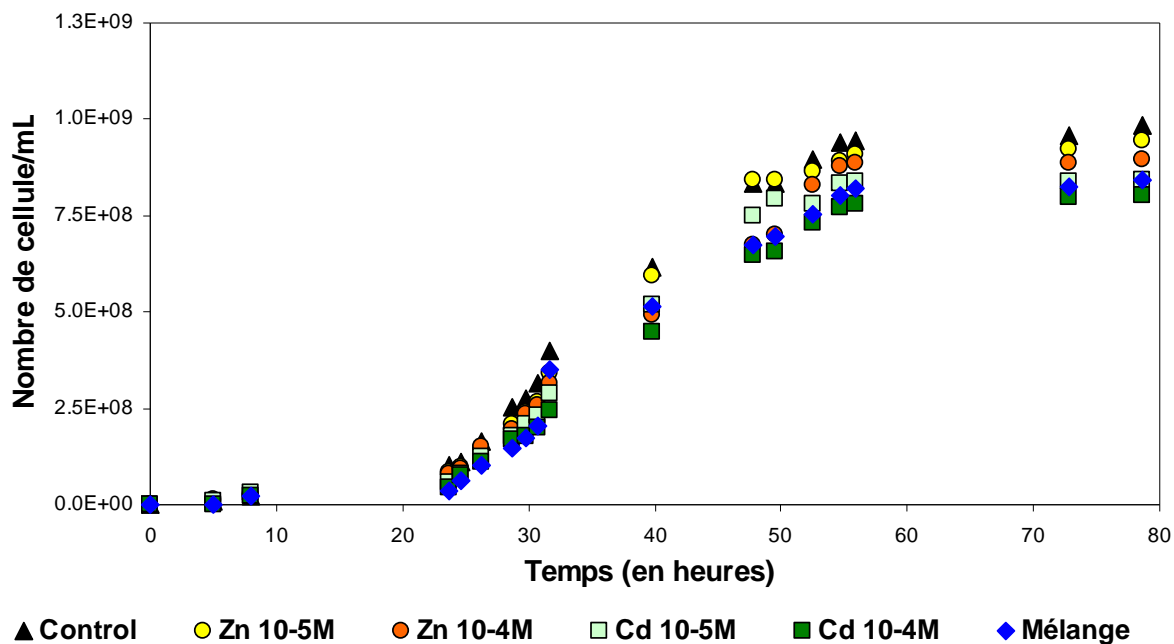


Figure III-4: Courbes de croissance de *Cupriavidus metallidurans* CH34, suivie par mesure de  $DO_{600nm}$  en présence ou absence de zinc et/ou de cadmium à  $0$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-4}M$ . Les résultats correspondent à la moyenne de triplicats.

Les courbes de croissance de *C. metallidurans* CH34 (Figure III-4) ne montrent pas d'effets de toxicité importants du Zn et du Cd en accord avec ses capacités connues de résistance aux métaux lourds de cette bactérie (Mergeay et al., 1987). Les taux de croissance calculés en présence de métaux sont en effet très similaires à ceux du témoin (Tableau III-1). On note toutefois une légère diminution des taux de croissance cellulaire de *C. metallidurans* CH34 aux plus fortes concentrations de Zn et Cd, sans doute liée à une dépense énergétique plus importante liée aux mécanismes de résistance à Zn et Cd (Roux et al. 2001).

Tableau III-1: Taux de croissance  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) et temps de génération (en min.) de la bactérie *Cupriavidus metallidurans* CH34 mesurés en milieu TSM en absence et en présence de Zn et Cd à  $10^{-5}$  et  $10^{-4}M$ .

	Temps de génération (min)	Taux de croissance $\mu$ ( $h^{-1}$ )
Témoin	253.5 ( $\pm 12.7$ )	0.16 ( $\pm 0.01$ )
Zn $10^{-5}M$	266.1 ( $\pm 7.6$ )	0.16 ( $\pm 0.01$ )
Zn $10^{-4}M$	305.4 ( $\pm 9.5$ )	0.14 ( $\pm 0.01$ )
Cd $10^{-5}M$	265.6 ( $\pm 14.5$ )	0.16 ( $\pm 0.01$ )
Cd $10^{-4}M$	290.5 ( $\pm 8.3$ )	0.14 ( $\pm 0.01$ )
Mélange $10^{-5}M$	272.8 ( $\pm 10.6$ )	0.15 ( $\pm 0.01$ )

La croissance des cellules de *C. metallidurans* CH34 n'est pas affectée par la présence de Cd et de Zn en mélange. En effet la courbe de croissance en présence de mélange est très similaire à celle du métal le plus toxique, soit le cadmium, à la même concentration. Le taux de croissance et le temps de génération sont proches de celui mesuré en présence de Cd  $10^{-5}$ M (Tableau III-1).

### III-3-1-3. Suivi de croissance des cellules de *Escherichia coli* K12Dh5a

La Figure III-5 montre que le Zn et le Cd semblent affecter légèrement la croissance de *E. coli* K12Dh5a en accord avec sa sensibilité plus forte aux métaux lourds par rapport à *C. metallidurans* CH34. Toutefois, et malgré ces légers effets, les concentrations métalliques utilisées lors de cette étude ne sont pas létales pour *E. coli* K12Dh5a indiquant que la bactérie possède des systèmes de résistance ou au moins de tolérance à ces deux métaux.

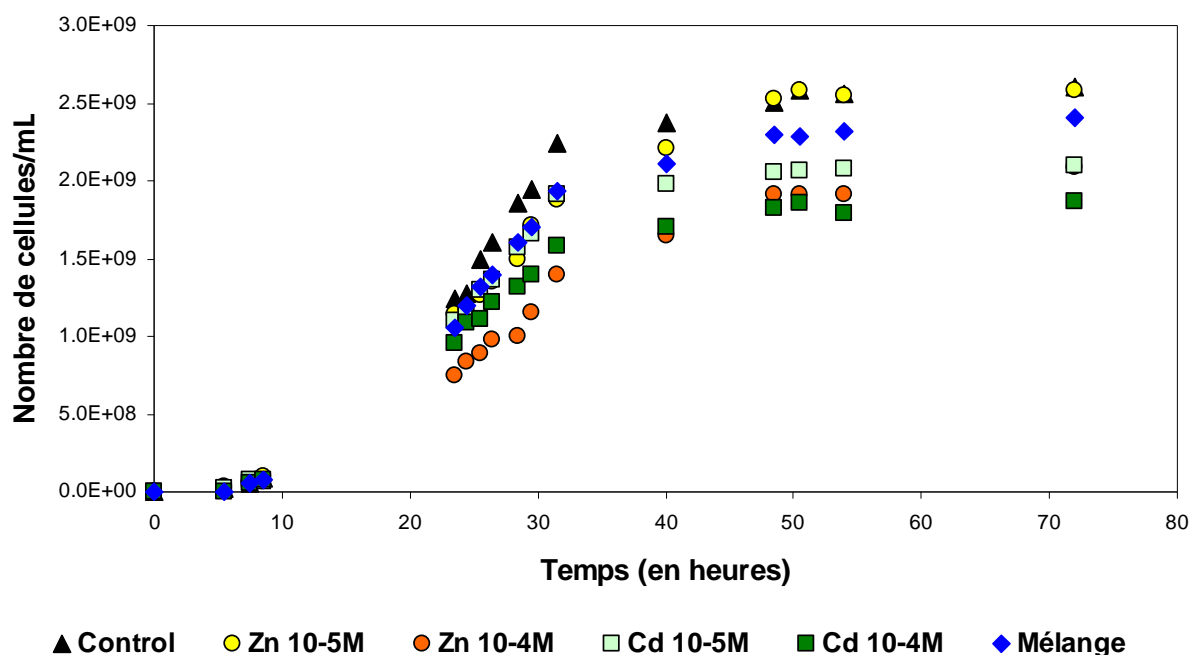


Figure III-5: Courbes de croissance de *Escherichia coli* K12DH5a, suivie par mesure de  $DO_{600nm}$  en présence ou absence de zinc et/ou de cadmium à 0,  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$ M. Les résultats correspondent à la moyenne de triplicats

Les taux de croissance diffèrent légèrement surtout pour le zinc aux 2 concentrations et pour le cadmium à la plus forte concentration (Tableau III-2). La croissance de *E. coli* K12Dh5a est légèrement affectée par la présence du Cd et du Zn en mélange à  $10^{-5}$ M par rapport au contrôle. En revanche la présence du Zn semble améliorer la « résistance » de *E. coli* K12Dh5a, au Cd. En effet le taux de croissance et le temps de génération sont compris entre ceux calculés en présence du Zn et du Cd seuls à  $10^{-5}$ M (Tableau III-2), confirmant la meilleure croissance de *E. coli* K12Dh5a en présence du mélange par rapport à l'exposition au Cd à  $10^{-5}$ M.

**Tableau III-2 : Taux de croissance  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) et temps de génération (en min.) de la bactérie *Escherichia coli* K12DH5 $\alpha$  mesurés en milieu M9 en absence et en présence de Zn et Cd à  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$ M.**

	<b>Temps de génération (min)</b>	<b>Taux de croissance <math>\mu</math> (<math>\text{h}^{-1}</math>)</b>
<b>Témoin</b>	<b>67.2 (<math>\pm</math> 3.1)</b>	<b>0.62 (<math>\pm</math> 0.03)</b>
<b>Zn <math>10^{-5}</math>M</b>	<b>76.2 (<math>\pm</math> 6.8)</b>	<b>0.59 (<math>\pm</math> 0.04)</b>
<b>Zn <math>10^{-4}</math>M</b>	<b>74.9 (<math>\pm</math> 2.3)</b>	<b>0.56 (<math>\pm</math> 0.02)</b>
<b>Cd <math>10^{-5}</math>M</b>	<b>66.8 (<math>\pm</math> 5.2)</b>	<b>0.60 (<math>\pm</math> 0.03)</b>
<b>Cd <math>10^{-4}</math>M</b>	<b>71.6 (<math>\pm</math> 2.2)</b>	<b>0.56 (<math>\pm</math> 0.03)</b>
<b>Mélange <math>10^{-5}</math>M</b>	<b>70.0 (<math>\pm</math> 4.1)</b>	<b>0.61 (<math>\pm</math> 0.05)</b>

#### III-3-1-4. Effet des métaux sur la viabilité cellulaire

L'effet des métaux sur la viabilité cellulaire de *C. metallidurans* CH34 a été évalué à l'aide du kit Live/Dead® BacLight™ (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) qui permet de colorer différemment les cellules viables et non viables, à certains moments clés de la cinétique de croissance des cellules. Cette approche n'a pas pu être appliquée pour *E. coli* K12Dh5 $\alpha$ , en raisons des problèmes « d'interférence » entre la protéine YFP produite par la bactérie et les fluorochromes du kit Live/Dead (notamment le Syto9) qui présentent des caractéristiques spectrales proches.

Trois temps spécifiques de mesure ont été choisis pour *C. metallidurans* CH34 dans la cinétique de croissance:

- en début de phase exponentielle (24h)
- en fin de phase exponentielle (48h)
- en phase stationnaire (72h)

Les résultats sont présentés dans le Tableau III-3, en pourcentage de cellules viables et endommagées en fonction de la présence ou non de métaux aux concentrations testées. On observe une augmentation du nombre de cellules endommagées avec le temps. En particulier, on remarque qu'en phase stationnaire le nombre de bactéries viables a diminué de 87% à 72% par rapport à la phase exponentielle. On ne voit pas d'effet net des métaux sur la viabilité de *C. metallidurans* CH34 pendant la phase exponentielle de croissance. Ces résultats confirment les résultats des cinétiques de croissance, obtenues pendant la phase exponentielle de croissance, par spectrophotométrie, qui n'avaient pas montré d'effet significatif des métaux, s'expliquant par la forte capacité de résistance aux métaux de *C. metallidurans* CH34. En revanche, dans la phase stationnaire (>48h), on note un effet du Cd à la plus forte concentration.

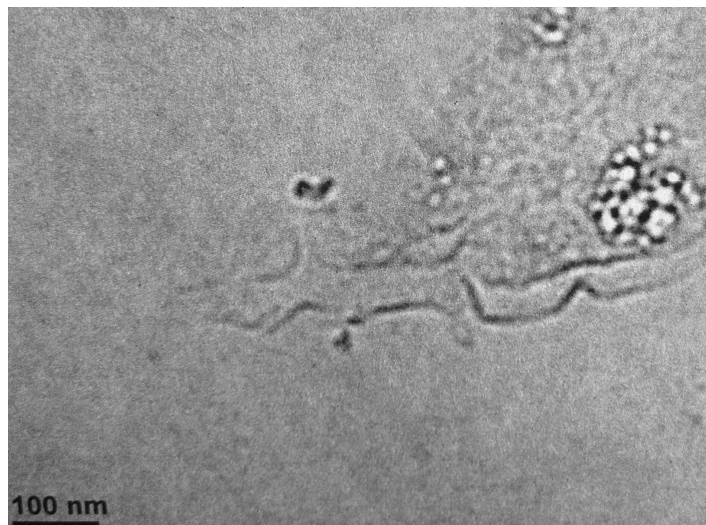
**Tableau III-3: Effet des métaux sur la viabilité des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 obtenus en cytométrie en flux avec l'utilisation du kit Live/Dead® BacLight™.**

	Conditions	% de cellules viables	% de cellules endommagées
<b>Début de phase exponentielle</b>	<b>Témoin</b>	<b>87.3 (± 2.1)</b>	<b>12.7 (± 2.1)</b>
	<b>Zn 10<sup>-5</sup>M</b>	<b>84.2 (± 1.7)</b>	<b>15.8 (± 1.7)</b>
	<b>Zn 10<sup>-4</sup>M</b>	<b>81.0 (± 2.5)</b>	<b>19.0 (± 2.5)</b>
	<b>Cd 10<sup>-5</sup>M</b>	<b>83.3 (± 0.9)</b>	<b>16.7 (± 0.9)</b>
	<b>Cd 10<sup>-4</sup>M</b>	<b>84.0 (± 3.1)</b>	<b>16.0 (± 3.1)</b>
	<b>Mélange 10<sup>-5</sup>M</b>	<b>83.2 (± 1.8)</b>	<b>16.8 (± 1.8)</b>
<b>Fin de phase exponentielle</b>	<b>Témoin</b>	<b>89.5 (± 0.6)</b>	<b>10.5 (± 0.6)</b>
	<b>Zn 10<sup>-5</sup>M</b>	<b>89.5 (± 1.0)</b>	<b>10.5 (± 1.0)</b>
	<b>Zn 10<sup>-4</sup>M</b>	<b>83.6 (± 1.8)</b>	<b>16.4 (± 1.8)</b>
	<b>Cd 10<sup>-5</sup>M</b>	<b>84.4 (± 0.7)</b>	<b>15.6 (± 0.7)</b>
	<b>Cd 10<sup>-4</sup>M</b>	<b>78.5 (± 0.5)</b>	<b>21.5 (± 0.5)</b>
	<b>Mélange 10<sup>-5</sup>M</b>	<b>80.3 (± 1.5)</b>	<b>19.7 (± 1.5)</b>
<b>Phase stationnaire</b>	<b>Témoin</b>	<b>72.0 (± 2.3)</b>	<b>28.0 (± 2.3)</b>
	<b>Zn 10<sup>-5</sup>M</b>	<b>72.9 (± 0.9)</b>	<b>27.1 (± 0.9)</b>
	<b>Zn 10<sup>-4</sup>M</b>	<b>71.9 (± 2.3)</b>	<b>28.1 (± 2.3)</b>
	<b>Cd 10<sup>-5</sup>M</b>	<b>74.6 (± 1.6)</b>	<b>25.4 (± 1.6)</b>
	<b>Cd 10<sup>-4</sup>M</b>	<b>66.4 (± 3.4)</b>	<b>33.6 (± 3.4)</b>
	<b>Mélange 10<sup>-5</sup>M</b>	<b>70.6 (± 1.9)</b>	<b>29.4 (± 1.9)</b>

Ces résultats sont toutefois à considérer comme des tendances car l'utilisation du kit live/Dead n'est pas parfaite pour l'étude de la viabilité cellulaire. Ainsi, Sträuber and Müller (2010) mettent en garde sur l'utilisation de la cytométrie en flux et l'utilisation de sondes fluorescentes pour l'évaluation de la viabilité cellulaire. Ils ont montré que la structure de la paroi des cellules ainsi que les propriétés chimiques des sondes utilisées déterminaient fortement les résultats obtenus. De plus certains auteurs ont pu mettre en avant que l'utilisation de l'IP combiné à une sonde fluorescente colorant les acides nucléiques (par exemple le Syto9) pouvait conduire à la création d'un état intermédiaire (ni rouge, ni vert), caractérisé par le degré de dommages subit par la membrane bactérienne (Berney et al., 2007;

Shi et al., 2007). Ce phénomène est spécifique aux bactéries à Gram négatif qui possède une membrane interne. De plus ces auteurs ont également mis en cause l'utilisation de l'IP comme indicateur de la viabilité cellulaire car les résultats obtenus étaient fortement dépendants de l'état physiologique des cellules. Pour certaines bactéries, ils ont montré que plus de 40% des cellules étaient marquées par l'IP pendant les premiers temps de la phase exponentielle et que seulement 2 à 5% étaient marquées en phase stationnaire (Berney et al., 2007; Shi et al., 2007).

Des analyses en Cryo-MET de cellules de *C. metallidurans* CH34 en présence de 100ppm de Cd, sous conditions actives d'exposition, ont montré que les membranes bactériennes présentent un aspect crénelé illustrant les dommages membranaires dus à la présence de Cd dans le milieu (Figure III-6).



**Figure III-6:** Observation en Cryo-MET de membranes endommagées de *Cupriavidus metallidurans* CH34 après contact avec 100 ppm de Cd en conditions actives d'exposition (30°C).

### **III-3-2. Etude de la biosorption du zinc et du cadmium et de leur distribution subcellulaire dans les cellules bactériennes inactives (4°C)**

#### **III-3-2-1. Données brutes**

L'étude de la distribution du zinc et du cadmium dans les deux bactéries modèles a été menée selon des conditions passives et actives d'exposition aux métaux à deux concentrations différentes ( $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  M). Les Tableaux III-4 et III-5 présentent les résultats des quantités (en  $\mu\text{g}$ ) de métal mesurées dans chaque compartiment subcellulaire. Les taux de récupération des métaux sont également présentés, permettant de calculer les bilans de masse expérimentaux. On remarque que d'une façon générale les bilans de masse sont satisfaisants (supérieur à 85 %), comme discuté dans le chapitre précédent.



**Tableau III-4: Distribution subcellulaire du cadmium dans les cellules de *Escherichia coli* K12DH5 $\alpha$  et *Cupriavidus metallidurans* CH34 en conditions d'exposition active (30°C) et passive (4°C) d'exposition aux métaux. Les données sont en  $\mu\text{g}$  de Cd par compartiment ( $\pm$ écart type calculé d'après des triplicats). La masse initiale de Cd (en  $\mu\text{g}$ ) et les pourcentages de récupération du Cd sont également indiqués.**

		Cellules inactives				Cellules actives			
Souche		<i>E. coli</i> K12Dh5 $\alpha$		<i>C. metallidurans</i> CH34		<i>E. coli</i> K12Dh5 $\alpha$		<i>C. metallidurans</i> CH34	
Concentration initiale		10 <sup>-5</sup> M	10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-5</sup> M	10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-5</sup> M	10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-5</sup> M	10 <sup>-4</sup> M
Compartiment	Extracellulaire	9.39 ( $\pm$ 2.39)	154.3 ( $\pm$ 10.03)	6.14 ( $\pm$ 0.35)	132.9 ( $\pm$ 4.98)	15.47 ( $\pm$ 1.27)	184.8 ( $\pm$ 18.33)	14.77 ( $\pm$ 0.96)	188.4 ( $\pm$ 3.91)
	Membranaire	0.52 ( $\pm$ 0.00)	2.17 ( $\pm$ 0.31)	1.48 ( $\pm$ 0.36)	4.25 ( $\pm$ 1.01)	0.39 ( $\pm$ 0.05)	0.65 ( $\pm$ 0.10)	0.78 ( $\pm$ 0.10)	1.37 ( $\pm$ 0.09)
	Intracellulaire	2.41 ( $\pm$ 0.11)	20.31 ( $\pm$ 3.02)	4.69 ( $\pm$ 0.59)	34.07 ( $\pm$ 3.29)	1.81 ( $\pm$ 0.79)	2.77 ( $\pm$ 0.57)	1.05 ( $\pm$ 0.57)	5.83 ( $\pm$ 0.97)
Masse initiale de Cd		13.07	180.7	13.80	179.1	18.24	189.5	17.67	197.5
% de récupération de Cd		94.3	97.8	89.2	95.6	96.9	99.3	93.9	99.1

**Tableau III-5: Distribution subcellulaire du zinc dans les cellules de *Escherichia coli* K12DH5 $\alpha$  et *Cupriavidus metallidurans* CH34 en conditions d'exposition active (30°C) et passive (4°C) d'exposition aux métaux. Les données sont en  $\mu\text{g}$  de Zn par compartiment ( $\pm$ écart type calculé d'après des triplicats). La masse initiale de Zn (en  $\mu\text{g}$ ) et les pourcentages de récupération du Zn sont également indiqués.**

		Cellules inactives				Cellules actives			
Souche		<i>E. coli</i> K12Dh5 $\alpha$		<i>C. metallidurans</i> CH34		<i>E. coli</i> K12Dh5 $\alpha$		<i>C. metallidurans</i> CH34	
Concentration initiale		10 <sup>-5</sup> M	10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-5</sup> M	10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-5</sup> M	10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-5</sup> M	10 <sup>-4</sup> M
Compartiment	Extracellulaire	6.49 ( $\pm$ 0.34)	97.18 ( $\pm$ 6.68)	5.20 ( $\pm$ 0.98)	60.23 ( $\pm$ 4.04)	9.46 ( $\pm$ 0.23)	79.98 ( $\pm$ 12.50)	9.56 ( $\pm$ 2.59)	110.73 ( $\pm$ 15.57)
	Membranaire	1.16 ( $\pm$ 0.16)	1.34 ( $\pm$ 0.44)	0.61 ( $\pm$ 0.05)	4.03 ( $\pm$ 0.61)	0.29 ( $\pm$ 0.03)	3.14 ( $\pm$ 0.03)	0.34 ( $\pm$ 0.08)	0.78 ( $\pm$ 0.18)
	Intracellulaire	3 ( $\pm$ 0.23)	7.14 ( $\pm$ 0.10)	3.72 ( $\pm$ 0.35)	24.96 ( $\pm$ 2.68)	1.75 ( $\pm$ 0.04)	5.84 ( $\pm$ 1.27)	2.05 ( $\pm$ 0.34)	3.42 ( $\pm$ 0.49)
Masse initiale de Zn		11.92	107.93	10.43	95.02	11.88	104.6	12.41	116.4
% de récupération de Zn		89.4	97.9	91.4	93.9	96.8	85.0	96.3	98.7

### III-3-2-2. Distribution subcellulaire du zinc et du cadmium dans les cellules inactives (4°C) de *Escherichia coli* K12Dh5α et de *Cupriavidus metallidurans* CH34

Pour une meilleure lisibilité, les résultats de distribution des métaux sont présentés sous forme d'histogrammes sur la Figure III-7 pour les deux bactéries. En conditions passives d'exposition aux métaux (4°C) on considère que les cellules sont métaboliquement inactives et que les phénomènes observés sont majoritairement dus à des mécanismes passifs. Dans ces conditions, sont en jeu les phénomènes d'adsorption passive sur les groupements fonctionnels de surface et de diffusion à travers les canaux membranaires. Concernant l'assimilation des métaux, elle est due principalement à de la diffusion et non à du transport actif.

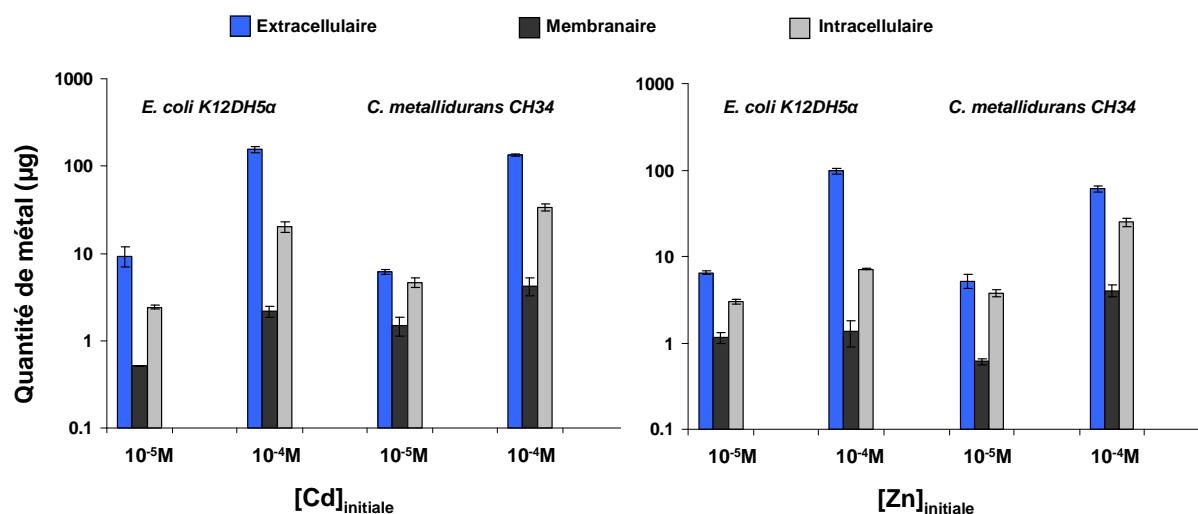


Figure III-7: Distribution du Cd et du Zn dans les trois compartiments subcellulaires des cellules de *Escherichia coli* K12Dh5α et de *Cupriavidus metallidurans* CH34 en conditions passives d'exposition (2 heures à 4°C). Les résultats sont représentés en µg de Cd et de Zn dans les 3 compartiments subcellulaires.

La Figure III-7 montre de manière surprenante qu'une majorité des métaux biosorbés est accumulés dans le cytoplasme des cellules, le compartiment membranaire ne représentant qu'une faible proportion du Cd bioaccumulé. A la plus faible concentration (10<sup>-5</sup>M), il y a respectivement **4.6** et **3.2** fois plus de Cd dans les compartiments intracellulaires de *E. coli* K12Dh5α et de *C. metallidurans* CH34 par rapport aux compartiments membranaires. A la plus forte concentration (10<sup>-4</sup>M), il y a respectivement **9.3** et **8.0** fois plus de métal dans les compartiments intracellulaires de *E. coli* K12Dh5α et de *C. metallidurans* CH34. Comme pour le Cd, les compartiments membranaires ne retiennent qu'une faible quantité du Zn total bioaccumulé. A la plus faible concentration, il y a respectivement **2.6** et **6.1** fois plus de métal dans le compartiment intracellulaire pour *E. coli* K12Dh5α et de *C. metallidurans* CH34. A la plus forte concentration, il y a respectivement **5.3** et **6.2** fois plus de métal dans les compartiments intracellulaires de *E. coli* K12Dh5α et de *C. metallidurans* CH34.

Les résultats montrent également un effet de concentration important pour les deux métaux. A la plus forte concentration (10<sup>-4</sup>M) les quantités totales de Cd et de Zn bioaccumulées, considérées comme la somme de métal membranaire et intracellulaire, sont plus élevées qu'à 10<sup>-5</sup>M. En effet, les cellules de *C. metallidurans* CH34 retiennent environ **7** fois plus de Zn et de Cd à la plus forte concentration. Les cellules de *E. coli* K12Dh5α

retiennent **6** fois plus de Cd et seulement **2.5** fois plus de Zn à la plus forte concentration. Toutefois cela correspond proportionnellement à une plus faible proportion relative de métal retenu (50% de moins) confirmant la non linéarité des processus de biosorption classiquement modélisé par des isothermes de type Langmuir (Figure III-8).

Les résultats montrent également que les deux bactéries réagissent différemment vis-à-vis des deux métaux modèles. Aux deux concentrations étudiées la biosorption passive des métaux semble être plus importante chez *C. metallidurans* CH34 que *E. coli* K12Dh5 $\alpha$ . En effet, les résultats montrent qu'en conditions passives d'exposition, les cellules de *C. metallidurans* retiennent plus de Cd que celles de *E. coli* K12Dh5 pour les deux concentrations d'étude : **2.1** fois plus à  $10^{-5}$ M et **1.7** fois plus à  $10^{-4}$ M. Concernant le Zn, à  $10^{-5}$ M les deux bactéries retiennent la même quantité de métal. En revanche, à  $10^{-4}$ M de Zn, les cellules de *C. metallidurans* CH34 retiennent **3.4** fois plus de Zn que celles de *E. coli* K12Dh5 $\alpha$ .

### III-3-2-3. Comparaison aux isothermes de sorption

Les résultats obtenus ont été comparés aux isothermes de sorption obtenus par Guiné et al. (2006, 2007), en considérant la somme de métal dans le compartiment membranaire et intracellulaire comme le total bioaccumulé par les cellules (Figure III-8). On note que les résultats obtenus par fractionnement physique en présence de Zn et de Cd sont en accord avec les isothermes d'adsorption obtenues par Guiné et al. (2006, 2007) pour les mêmes couples bactéries-métaux. Pour le zinc, bien que les données soient un peu plus dispersées, les résultats obtenus sont en bonne correspondance avec les résultats obtenus par Guiné et al. (2006, 2007) et confirment les résultats obtenus dans le chapitre II.

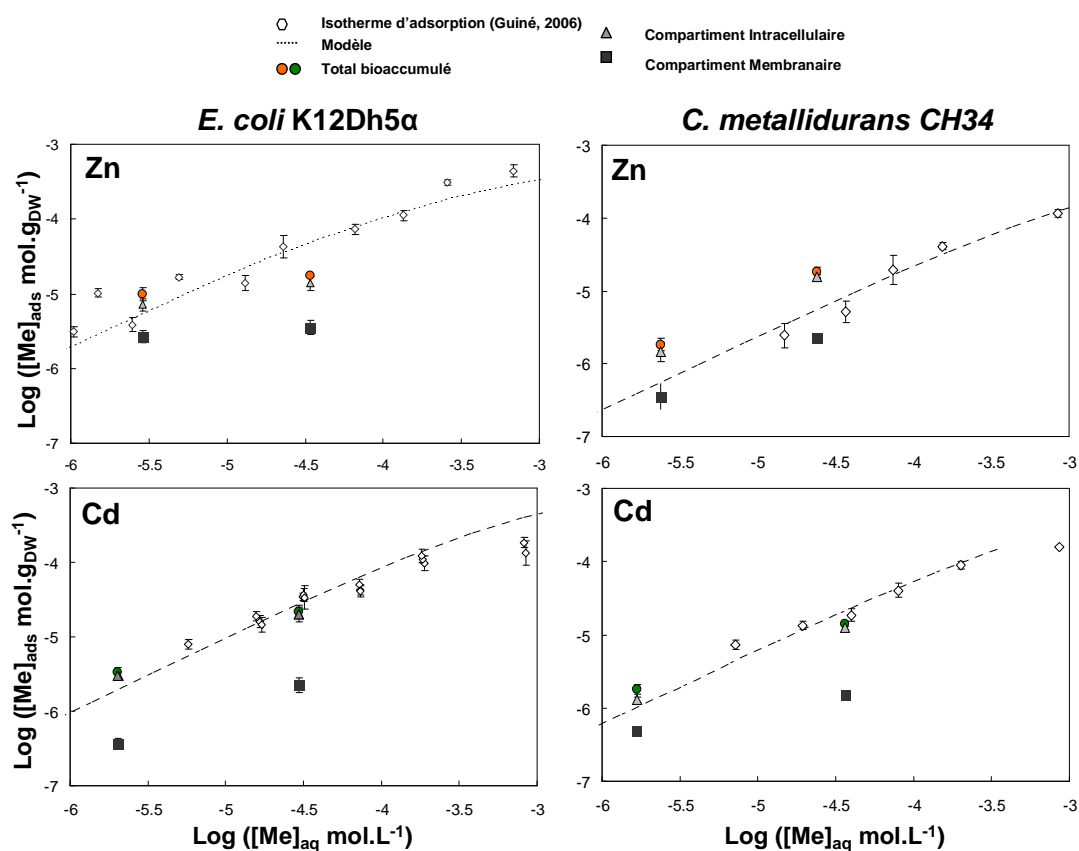


Figure III-8: Isothermes de sorption du Zn et du Cd sur les cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 et de *Escherichia coli* K12DH $\alpha$  (Guiné, 2006 ; Guiné et al., 2006, 2007).

**III-3-2-4. Distribution subcellulaire du zinc et du cadmium en mélange dans des cellules inactives (4°C) de *Escherichia coli* K12Dh5a et *Cupriavidus metallidurans* CH34**

L'étude de la distribution du zinc et du cadmium en conditions de mélange chez les deux bactéries modèles a été menée en conditions passives et actives d'exposition au mélange des deux métaux à  $10^{-5}$  M. Le Tableau III-6 présente les résultats des quantités de métal mesurées dans chaque compartiment subcellulaire en  $\mu\text{g}$ . On remarque que d'une façon générale les bilans de masse sont satisfaisants (supérieurs à 82 %)

**Tableau III-6 : Distribution subcellulaire du cadmium et du zinc sur les cellules de *Escherichia coli* K12DH5 $\alpha$  et *Cupriavidus metallidurans* CH34 en conditions actives et passives d'exposition à Cd et Zn en mélange. Les données sont en  $\mu\text{g}$  de métal par compartiment ( $\pm 1$  écart type calculé d'après les triplicats). La masse initiale de contamination (en  $\mu\text{g}$ ) et les pourcentages de récupération sont également indiqués.**

Conditions expérimentales		Cellules inactives				Cellules actives			
Souche		<i>E. coli</i> K12Dh5 $\alpha$		<i>C. metallidurans</i> CH34		<i>E. coli</i> K12Dh5 $\alpha$		<i>C. metallidurans</i> CH34	
	Métal	Cd	Zn	Cd	Zn	Cd	Zn	Cd	Zn
Compartiment	Extracellulaire	11.40 ( $\pm 0.82$ )	9.83 ( $\pm 0.31$ )	6.25 ( $\pm 0.35$ )	5.91 ( $\pm 0.44$ )	18.48 ( $\pm 0.62$ )	15.58 ( $\pm 0.43$ )	16.55 ( $\pm 1.54$ )	13.44 ( $\pm 1.28$ )
	Membranaire	0.20 ( $\pm 0.07$ )	0.51 ( $\pm 0.04$ )	1.27 ( $\pm 0.18$ )	1.32 ( $\pm 0.22$ )	0.00 ( $\pm 0.00$ )	0.74 ( $\pm 0.02$ )	0.37 ( $\pm 0.08$ )	1.22 ( $\pm 0.22$ )
	Intracellulaire	2.88 ( $\pm 0.11$ )	1.56 ( $\pm 0.18$ )	4.76 ( $\pm 0.01$ )	3.53 ( $\pm 0.73$ )	0.24 ( $\pm 0.01$ )	0.78 ( $\pm 0.15$ )	1.02 ( $\pm 0.07$ )	1.77 ( $\pm 0.16$ )
Masse initiale de métal ( $\mu\text{g}$ )		14.8	12.9	15.0	12.6	18.8	17.7	18.6	18.3
% de récupération de métal		98.2	92.2	81.9	85.4	99.8	96.8	96.2	89.6

Comme pour les métaux seuls, les résultats de distribution subcellulaire du zinc et du cadmium en mélange sont présentés sous forme d'histogrammes sur la Figure III-9.

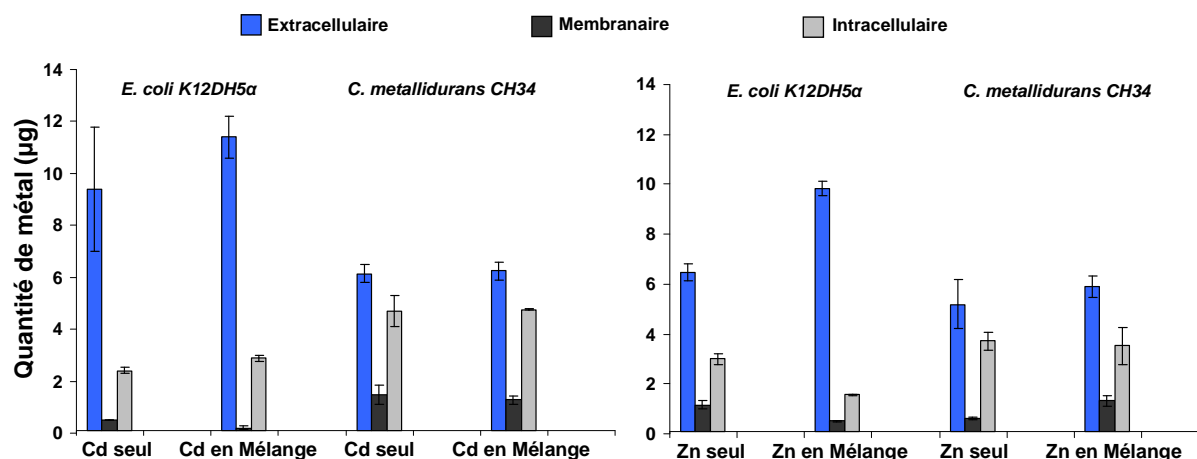


Figure III-9: Distribution du Zn et du Cd, seuls ou en mélange, dans les trois compartiments subcellulaires des cellules de *Escherichia coli* K12DH5a et de *Cupriavidus metallidurans* CH34 en conditions passives d'exposition (2 heures à 4°C).

Les résultats de la Figure III-9 et du Tableau III-7 montrent que pour *C. metallidurans* CH34, la présence de Zn ne semble pas modifier les quantités de Cd bioaccumulé, tant au niveau membranaire qu'intracellulaire. En revanche la présence de Cd entraîne une augmentation (x 2) de la quantité de Zn sorbée aux membranes et une légère diminution, non significative, de la quantité de Zn internalisée. Les cellules de *C. metallidurans* CH34 bioaccumulent un peu plus de Zn en présence qu'en absence de Cd mais de manière non significative. D'une manière générale il ne semble pas y avoir d'effet de compétition entre le Cd et le Zn à ces concentrations sur leur distribution subcellulaire dans les cellules de *C. metallidurans* CH34 en conditions passives d'exposition. Ceci est confirmé par le fait que la somme de métal bioaccumulé en conditions de mélabge, soit cadmium plus zinc, est similaire à la somme de Cd et de Zn bioaccumulé en conditions de monoexpositions.

Tableau III-7: Comparaison des quantités totales de Zn et de Cd membranaires intracellulaire et de la quantité de métal total bioaccumulé (en µg) biosorbées par les cellules inactives de *Cupriavidus metallidurans* CH34.

	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34				
	Cd seul	Zn seul	Cd en présence de Zn	Zn en présence de Cd	Total mélange
Membrane	1.48	0.61	1.27	1.32	2.59
Cytoplasme	4.69	3.72	4.76	3.53	8.29
Total bioaccumulé	6.17	4.33	6.03	4.85	10.88

Les résultats de la Figure III-9 et du Tableau III-8 montrent que la présence de Zn ne semble pas avoir d'effet significatif sur le Cd total bioaccumulé par *E. coli* K12DH5a. On ne note pas de variations des quantités de Cd associées aux membranes ou internalisées en présence de Zn par rapport aux conditions de mono exposition au Cd ( $10^{-5}$ M). En revanche, la présence de Cd entraîne une forte diminution du Zn total bioaccumulé par les cellules de *E. coli* K12DH5a par rapport aux conditions de mono exposition en Zn ( $10^{-5}$ M), caractérisée par

une diminution significative (de 50% environ) de la quantité de Zn sorbée aux membranes et internalisée. De plus, ceci est confirmé par le fait que la somme de métal bioaccumulé par les cellules de *E. coli* K12Dh5α en conditions de mélange, cadmium plus zinc, est moins importante qu'en conditions de mono-exposition au Cd ou au Zn.

Tableau III-8 : Comparaison des quantités de Zn et de Cd dans les compartiments membranaires, intracellulaire et la quantité de métal total bioaccumulé (en µg) entre les conditions mono exposition et conditions de mélange chez *Escherichia coli* K12Dh5α.

	<i>Escherichia coli</i> K12Dh5α				
	Cd seul	Zn seul	Cd en présence de Zn	Zn en présence de Cd	Total mélange
Membrane	0.52	1.16	0.2	0.51	0.71
Cytoplasme	2.41	3	2.88	1.56	4.44
Total bioaccumulé	2.93	4.16	3.08	2.07	5.15

### III-3-3. Distribution subcellulaire du zinc et du cadmium biosorbées par des cellules actives (30°C) de *Escherichia coli* K12Dh5α et *Cupriavidus metallidurans* CH34

#### III-3-3-1. Cas du zinc et du cadmium seuls

Les résultats de distribution subcellulaire du cadmium et du zinc dans les bactéries modèles en condition actives d'exposition sont présentés dans la Figure III-10 et dans les Tableaux III-4 et III-5.

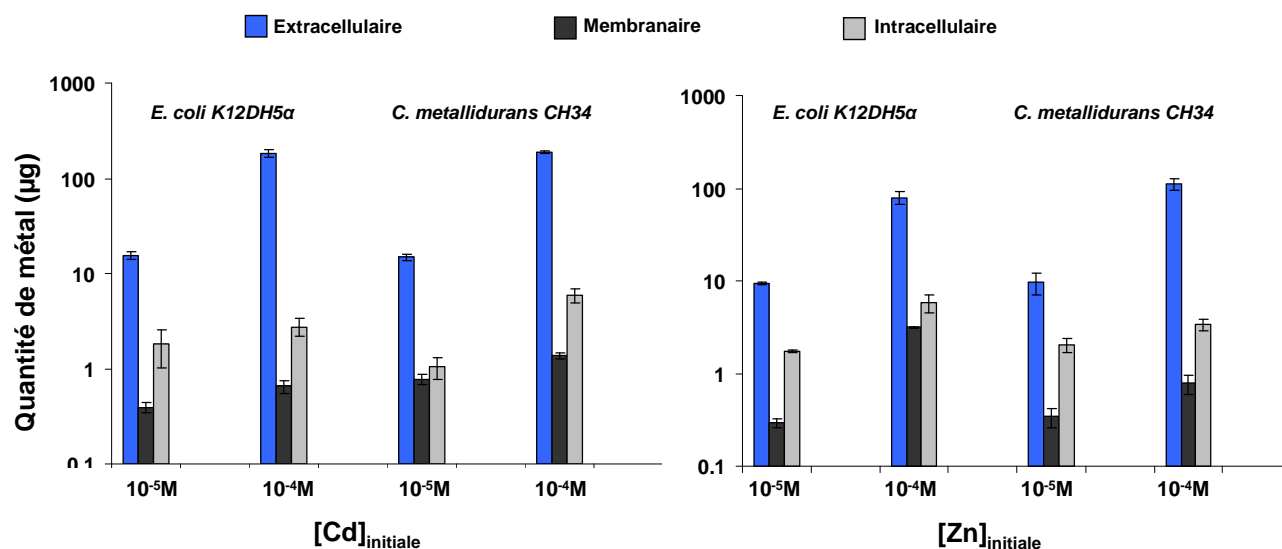


Figure III-10: Distribution du Cd et du Zn dans les trois compartiments subcellulaire des cellules de *Escherichia coli* K12Dh5α et de *Cupriavidus metallidurans* CH34 en conditions actives d'exposition (48 heures à 30°C). Les résultats sont représentés en µg de Cd et de Zn dans les 3 compartiments subcellulaire.

On note que les quantités totales de Cd et Zn bioaccumulées sont plus faibles qu'en conditions passives d'exposition pour les deux bactéries modèles. Ceci se traduit par une



diminution des quantités de Cd et de Zn sorbées aux membranes ainsi qu'une forte diminution des quantités internalisées, en particulier à la plus forte concentration ( $10^{-4}$ M). En effet, dans les conditions où les cellules se sont développées en présence de métaux, le zinc et le cadmium sont peu bioaccumulés (moins de 20%) et présentent des distributions subcellulaires relativement proches dans les deux bactéries. On note également un effet de concentration mais beaucoup moins marqué qu'avec des cellules inactives. Ces résultats indiquent que pour se protéger de la toxicité des métaux les bactéries tentent de limiter au maximum les quantités de Cd et de Zn au niveau membranaire et intracellulaire par la mise en place de mécanismes actifs.

### III-3-3-2. Cas du zinc et du cadmium en mélange

Les résultats de distribution subcellulaire du mélange zinc/cadmium à  $10^{-5}$ M dans des cellules actives sont présentés sous forme d'histogrammes sur la Figure III-11 pour le zinc et pour le cadmium.

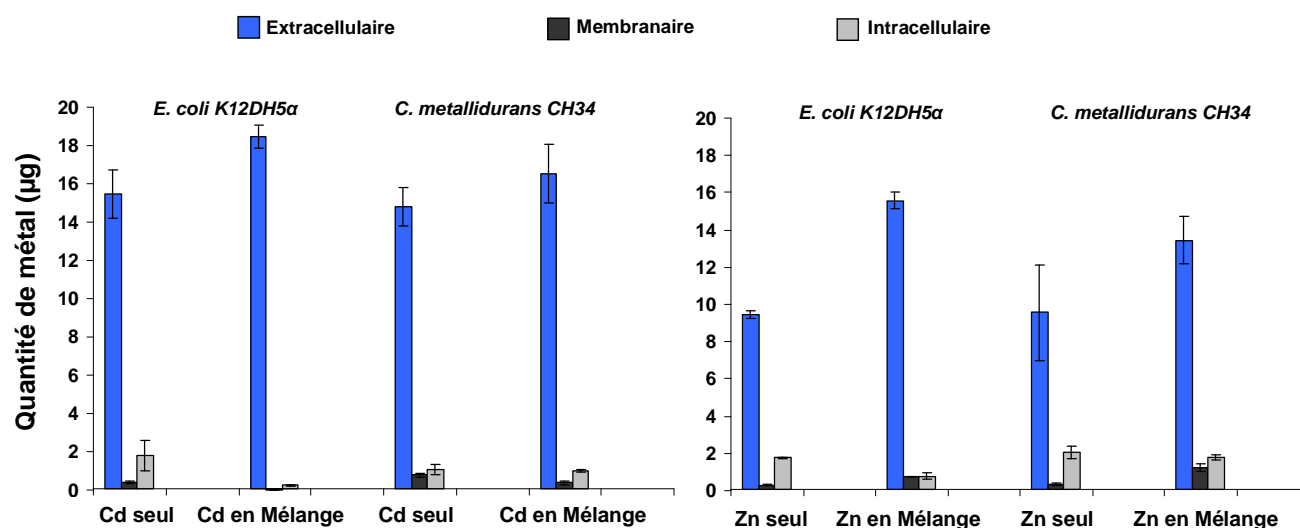


Figure III-11: Distribution du Zn et du Cd, seuls ou en mélange, dans les trois compartiments subcellulaires des cellules de *Escherichia coli* K12Dh5a et de *Cupriavidus metallidurans* CH34 en conditions actives d'exposition (48 heures à 30°C).

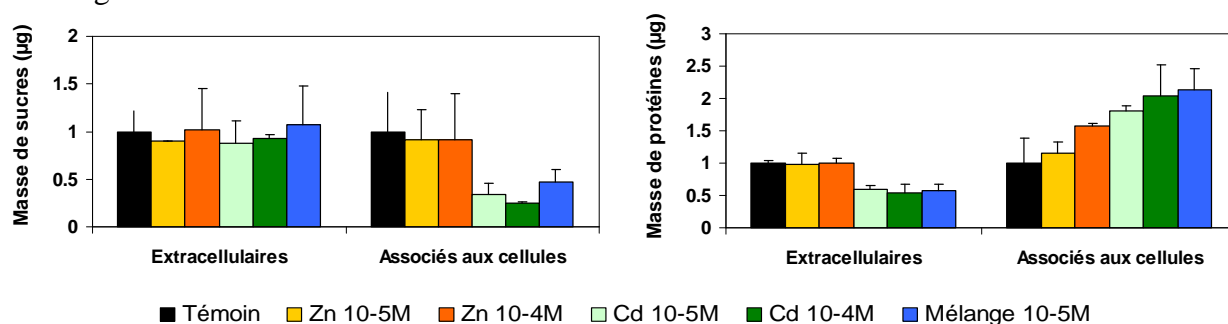
Comme avec les cellules inactivées, on observe avec des cellules actives un léger effet de compétition entre le Zn et le Cd en mélange sur leur distribution subcellulaire pour *C. metallidurans* CH34 par rapport aux mêmes conditions mais avec un seul métal modèles. En revanche la présence de Zn entraîne une forte diminution de la quantité totale de Cd bioaccumulée par les cellules de *E. coli* K12Dh5a (de 2.2 à 0.24 µg) caractérisée par une diminution importante des quantités de Cd sorbées sur les membranes qui deviennent indétectables ici, et internalisées (de 1.81 à 0.24 µg), par rapport à la biosorption du Cd sur des cellules actives. On observe également une légère diminution de la quantité totale de Zn bioaccumulée en présence de Cd par les cellules de *E. coli* K12Dh5a (de 2.04 à 1.52 µg) surtout caractérisée par une forte diminution au niveau du compartiment intracellulaire (de 1.75 à 0.78 µg). En présence de Cd, la rétention du Zn augmente dans le compartiment membranaire pour les 2 bactéries (de 0.34 µg à 1.22 pour *C. metallidurans* CH34 et de 0.29 µg à 0.74 µg pour *E. coli* K12Dh5a), indiquant un piégeage de ce métal dans ce compartiment. Au contraire, l'adsorption membranaire du Cd diminue pour les 2 bactéries en présence de Zn par rapport au Cd seul : de 0.78 à 0.37 µg pour *C. metallidurans* CH34 et de 0.39 à 0 µg pour *E. coli* K12Dh5a.

### III-3-3. Dosages biochimiques des protéines et sucres en fin de croissance cellulaire

Afin d'évaluer la surproduction de polysaccharides ou de protéines par les bactéries en réponse à la présence des métaux, nous avons quantifié ces deux types de composés dans le milieu de culture et dans les culots bactériens après 48h de croissance en présence ou absence de métal aux différentes concentrations. Les résultats sont normalisés par rapport au témoin afin de comparer l'effet des métaux sur la production et/ou la consommation de protéines et de sucres totaux initialement présents dans le milieu de culture.

#### Cas de *Cupriavidus metallidurans* CH34

Les résultats concernant le dosage des protéines et des sucres totaux consommés ou produits par *C. metallidurans* CH34 en fin de croissance avec et sans métaux sont présentés sur la Figure III-12 et le Tableau III-9.



**Figure III-12 :** Quantification des protéines et des sucres totaux dans le milieu de culture et dans les cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 après 48 heures de croissance en milieu TSM en absence et en présence de métaux. Les résultats sont normalisés par rapport au témoin (100%), les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types calculés avec des triplicats.

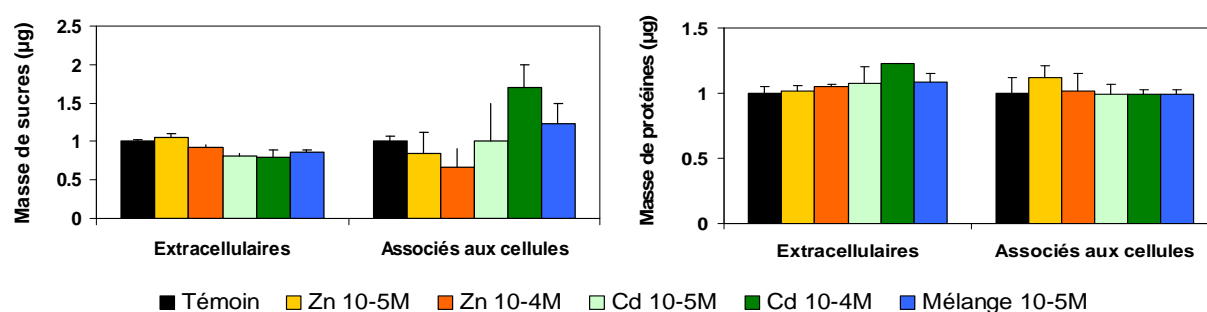
La Figure III-12 montre une diminution des protéines dans le milieu extracellulaire en présence de Cd seul ou en mélange peut être due à une augmentation de l'activité cellulaire (consommation de nutriments) pour combler la dépense énergétique mise en place par les cellules pour se protéger. En revanche la présence de métaux semble entraîner une augmentation de la quantité de protéines associées aux cellules. Cette augmentation est d'autant plus importante que le métal est toxique ( $\text{Cd} > \text{Zn}$ ) et à forte concentration ( $10^{-4}\text{M} > 10^{-5}\text{M}$ ). On note que la consommation et la production de sucres ne semblent pas être affectées par la présence de zinc au cours de la croissance de *C. metallidurans* CH34, quelle que soit sa concentration. En revanche la présence de Cd induit une diminution importante de la quantité de sucres associés aux cellules, notamment à forte concentration de Cd. La présence de Zn avec le Cd réduit légèrement cet effet. Dans une moindre mesure, on observe une légère baisse des sucres associés aux cellules en présence de zinc. Ces résultats peuvent s'expliquer soit par l'inhibition de la synthèse de sucres au niveau de la cellule (effet toxique), soit par une augmentation de la consommation de sucres, initialement présents dans le milieu, comme réserve énergétique pour se défendre contre la toxicité du cadmium.

**Tableau III-9: Masses de protéines et de sucres totaux (en  $\mu\text{g}$ ) dans le milieu de culture et associés aux cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 après 48 heures de croissance en milieu TSM en absence et en présence de métaux.**

<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34				
	Masse de protéines extracellulaires ( $\mu\text{g}$ )	Masse de protéines associées aux cellules ( $\mu\text{g}$ )	Masse de sucres extracellulaires ( $\mu\text{g}$ )	Masse de sucres associées aux cellules ( $\mu\text{g}$ )
Témoin	3.47 ( $\pm 0.11$ )	0.93 ( $\pm 0.36$ )	2.61 ( $\pm 0.57$ )	1.18 ( $\pm 0.54$ )
Zn $10^{-5}\text{M}$	3.43 ( $\pm 0.56$ )	1.07 ( $\pm 0.16$ )	2.36 ( $\pm 0.02$ )	1.08 ( $\pm 0.37$ )
Zn $10^{-4}\text{M}$	3.46 ( $\pm 0.25$ )	1.46 ( $\pm 0.05$ )	2.66 ( $\pm 1.12$ )	1.08 ( $\pm 0.57$ )
Cd $10^{-5}\text{M}$	2.08 ( $\pm 0.22$ )	1.67 ( $\pm 0.07$ )	2.29 ( $\pm 0.61$ )	0.40 ( $\pm 0.14$ )
Cd $10^{-4}\text{M}$	1.90 ( $\pm 0.46$ )	1.89 ( $\pm 0.44$ )	2.42 ( $\pm 0.10$ )	0.29 ( $\pm 0.02$ )
Mélange $10^{-5}\text{M}$	1.97 ( $\pm 0.39$ )	1.98 ( $\pm 0.30$ )	2.81 ( $\pm 1.06$ )	0.55 ( $\pm 0.16$ )

### Cas de *Escherichia coli* K12DH5a

Les résultats concernant le dosage des protéines et des sucres totaux consommés ou produits par *E. coli* K12DH5a en fin de croissance avec et sans métaux sont présentés sur la Figure III-13 et le Tableau III-10.



**Figure III-13: Quantification des protéines et des sucres totaux dans le milieu de culture et dans les cellules de *Escherichia coli* K12DH5a après 48 heures de croissance en milieu M9 en absence et en présence de métaux. Les résultats sont normalisés par rapport au témoin, les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types calculés avec des triplicats.**

La Figure III-13 montre l'absence d'effet du Zn sur la consommation et la production de sucres chez *E. coli* K12Dh5a après 48 heures de croissance en milieu M9, excepté à la plus forte concentration qui induit une légère diminution de la teneur en sucres des bactéries. En revanche, on observe une augmentation importante des sucres associés aux cellules lorsqu'elles se sont développées en présence de cadmium. Cet effet semble proportionnel à la concentration métallique mais semble plus limité en présence de Cd et de Zn. Les fortes quantités de sucres au niveau extracellulaire (Tableau III-10) sont dues à la présence de glucose dans le milieu M9 apporté comme source énergétique pour la croissance de *E. coli* K12DH5a. On observe que la consommation et/ou la production de protéines par les cellules de *E. coli* K12DH5a ne sont pas affectées significativement par la présence des métaux seuls ou en mélange. Seule la plus forte concentration de Cd dans le milieu peut s'expliquer par une diminution de la consommation des protéines au niveau extracellulaire, probablement en relation avec sa toxicité (bien que non confirmée par la courbe de croissance) ou encore par la surproduction et l'excrétion de polymères protéiques en réponse à la présence de Cd dans le milieu, servant à inerte ce toxique.

**Tableau III-10 : Masse de protéines et de sucres totaux (en  $\mu\text{g}$ ) dans le milieu de culture et associés aux cellules de *Escherichia coli* K12DH5a après 48 heures de croissance en milieu M9 en absence et en présence de métaux.**

<i>Escherichia coli</i> K12Dh5a				
	Masse de protéines extracellulaires ( $\mu\text{g}$ )	Masse de protéines associées aux cellules ( $\mu\text{g}$ )	Masse de sucres extracellulaires ( $\mu\text{g}$ )	Masse de sucres associés aux cellules ( $\mu\text{g}$ )
<b>Témoin</b>	<b>2.75</b> ( $\pm 0.14$ )	<b>3.47</b> ( $\pm 0.40$ )	<b>105.6</b> ( $\pm 2.19$ )	<b>0.42</b> ( $\pm 0.03$ )
<b>Zn <math>10^{-5}\text{M}</math></b>	<b>2.79</b> ( $\pm 0.13$ )	<b>3.88</b> ( $\pm 0.33$ )	<b>112.1</b> ( $\pm 4.97$ )	<b>0.35</b> ( $\pm 0.12$ )
<b>Zn <math>10^{-4}\text{M}</math></b>	<b>2.88</b> ( $\pm 0.05$ )	<b>3.53</b> ( $\pm 0.47$ )	<b>98.3</b> ( $\pm 3.00$ )	<b>0.28</b> ( $\pm 0.10$ )
<b>Cd <math>10^{-5}\text{M}</math></b>	<b>2.97</b> ( $\pm 0.36$ )	<b>3.43</b> ( $\pm 0.28$ )	<b>85.8</b> ( $\pm 3.82$ )	<b>0.42</b> ( $\pm 0.20$ )
<b>Cd <math>10^{-4}\text{M}</math></b>	<b>3.37</b> ( $\pm 0.01$ )	<b>3.43</b> ( $\pm 0.13$ )	<b>83.8</b> ( $\pm 11.16$ )	<b>0.71</b> ( $\pm 0.13$ )
<b>Mélange <math>10^{-5}\text{M}</math></b>	<b>3.00</b> ( $\pm 0.18$ )	<b>3.45</b> ( $\pm 0.10$ )	<b>91.5</b> ( $\pm 3.00$ )	<b>0.52</b> ( $\pm 0.11$ )

## III-4. Discussion

### III-4-1. Biosorption et distribution subcellulaire du zinc et du cadmium dans des cellules inactives ( $4^{\circ}\text{C}$ ) de *Escherichia coli* K12Dh5a et de *Cupriavidus metallidurans* CH34

La méthodologie de fractionnement physique que nous avons développé pour l'étude de la distribution subcellulaire du zinc et cadmium chez les 2 bactéries modèles par fractionnement physique semble validée par nos résultats. Les craintes d'une éventuelle redistribution des métaux lors de la casse cellulaire par cette méthodologie sont limitées par le fait que c'est une méthodologie très largement utilisée en biologie cellulaire pour ce genre d'approche et que si c'était le cas on aurait observé des profils de distribution similaires pour toutes les conditions testées y compris entre les expositions actives et passives aux métaux.

Les résultats obtenus ont montré que pour les deux concentrations d'étude, le cadmium et le zinc sont fortement fixés par les deux bactéries, jusqu'à 50% du Zn ou du Cd en solution pour *C. metallidurans* CH34 et 40% pour *E. coli* K12Dh5a. Pardo et al. (2003) ont montré que des cellules inactivées de *Pseudomonas putida* étaient capables de biosorber jusqu'à 80% de Pb, Cu, Cd et Zn, confirmant ainsi la capacité des cellules bactériennes à biosorber de grandes quantités de métaux lourds en conditions passives d'exposition. De manière surprenante, on observe que le compartiment majeur d'accumulation métallique semble être le cytoplasme, qui retient plus de 75 % des métaux bioaccumulés pour les deux bactéries, indépendamment de la concentration. Étonnamment le compartiment membranaire de nos deux bactéries à Gram négatif s'avère fixer peu de métaux, en désaccord avec le concept bien accepté de complexation métallique sur les surfaces des bactéries (Fein et al., 1997; Yee and Fein, 2001; Guiné et al., 2006). Guiné et al. (2006) ont suggéré que l'adsorption aux groupements fonctionnels est limitée par la surface des cellules et la densité de ces sites et ne permet pas d'expliquer les quantités totales de métaux bioaccumulés par les bactéries. Nos résultats confirment ces résultats préliminaires et mettent en avant la capacité des bactéries modèles à internaliser de fortes quantités de Cd et de Zn en conditions passives d'exposition (cellules inactivées à  $4^{\circ}\text{C}$ ).

Les résultats obtenus montrent également que les deux bactéries présentent des profils de distribution subcellulaire des métaux sensiblement différents en accord avec leur sensibilité variable aux métaux lourds. La rétention passive des métaux semble être plus importante chez *C. metallidurans* CH34 que chez *E. coli* K12Dh5a. Les plus faibles quantités internalisées par *E. coli* K12Dh5a pourraient indiquer une première forme de protection, de la part de *E. coli* K12Dh5a, vis-à-vis des métaux par une limitation de la diffusion passive

(moins de porines, membrane moins perméable) et un contrôle de l'entrée de métaux plus important. L'homéostasie des métaux dans les cellules étant contrôlée par des processus actifs (voir chapitre I), il n'est pas surprenant d'observer une forte concentration métallique dans des cellules inactives. Cela pourrait expliquer les plus fortes quantités de métaux dans le cytoplasme observées pour *C. metallidurans* CH34. En effet cette souche est connue pour posséder des systèmes d'efflux important (Mergeay et al., 1987; Rozycki and Nies, 2008), lui permettant de contrôler facilement l'homéostasie des métaux, même en présence de fortes concentrations puisqu'elle est capable de les rejeter efficacement vers l'extérieur via une forte consommation d'énergie (plus forte consommation de sucres du milieu extérieur).

Nos résultats ont également montré que les mécanismes de rétention des métaux par les bactéries s'avèrent être contrôlés par la concentration métallique extérieure. En effet, les quantités de métaux internalisées, sont plus importantes à plus forte concentration ( $10^{-4}$ M) pour les 2 bactéries modèles. En revanche on a pu remarquer que cela correspond proportionnellement à une plus faible proportion relative de métal retenu (environ 50% de moins) confirmant la non linéarité des processus de biosorption généralement observés (Isotherme de type Langmuir). D'une manière générale, les résultats montrent que dans des conditions passives d'exposition, la diffusion à l'intérieur des cellules des deux bactéries modèles est importante et qu'il y a donc nécessité pour les cellules bactériennes d'un contrôle actif des métaux pour réguler les concentrations internes et membranaires et donc se protéger de la toxicité.

#### **III-4-2. Biosorption et distribution subcellulaire du zinc et du cadmium dans des cellules actives (30°C) de *Escherichia coli* K12Dh5α et de *Cupriavidus metallidurans* CH34**

Les résultats obtenus en conditions actives d'exposition aux métaux ont montré que les cellules actives bioaccumulent des quantités plus faibles de métaux (jusqu'à 7 fois moins de biosorption à  $10^{-4}$ M). Cette diminution de bioaccumulation de métaux par des cellules métaboliquement actives peut être induites par différents mécanismes ou stratégies mises en place par les bactéries. La première possibilité est la mise en place de systèmes d'efflux bien connus chez *C. metallidurans* CH34 et chez les bactéries résistantes (Mergeay et al., 1987; Saier et al., 1994; Ehrlich, 1997; Bruins et al., 2000; Gadd, 2000; Ledin, 2000; Nies, 2003; Haferburg and Kothe, 2007; Bai et al., 2008; Rozycki and Nies, 2008). Les bactéries ont également pu surproduire des EPS capables de piéger des métaux sur ou à l'extérieur des cellules pour se protéger du stress induit par les fortes concentrations en métaux (Bhaskar and Bhosle, 2006; Comte, Guibaud, and Baudu, 2006a; Ueshima et al., 2008, 2008; Bunge et al., 2010; Ha et al., 2010). Enfin, certaines bactéries sont capables de modifier la structure ou la composition de leur membrane afin de limiter les phénomènes de diffusion ou de sorption des métaux (Bruins et al., 2000).

Johnson et al. (2007) ont montré que par rapport à des cellules inactives, l'activité métabolique des cellules crée un potentiel électrique à travers la membrane plasmique, appelé « force motrice protonique » (PMF en anglais). En conditions aérobies, les protons sont pompés à travers la membrane plasmique vers l'extérieur de la cellule, et des électrons ou des espèces chimiques négativement chargées ( $\text{OH}^-$ ...) se concentrent dans la cellule. La PMF est une composante essentielle du métabolisme bactérien puisqu'elle permet le retour des protons à l'intérieur de la cellule via des pompes ATPases ou pompes à protons (Urrutia Mera et al., 1992; Kemper et al., 1993). Dans ces conditions on peut supposer que le pH plus faible associé à l'environnement de la membrane entraîne une diminution de l'adsorption des cations métalliques, et donc du Zn et du Cd, sur les groupements fonctionnels de surface,

contribuant ainsi également à expliquer la diminution de la biosorption de ces métaux par les cellules actives (Urrutia Mera et al., 1992; Kemper et al., 1993). Ainsi on pourrait observer une compétition entre les protons et les cations entraînant une plus faible sorption des métaux sur les cellules métaboliquement actives. Toutefois Johnson et al. (2007) ont remarqué que les bactéries à Gram positif adsorbaient plus de métaux lorsqu'elles étaient actives mais pas chez les bactéries à Gram négatif, comme celles étudiées dans notre étude. Les différences observées étant expliquées par des différences au niveau membranaire : les sites de fixations des métaux étant extérieurs à la couche de peptidoglycane Johnson et al. (2007). On devrait donc pouvoir négliger ce processus dans notre étude.

Concernant la mise en place de mécanismes d'efflux, *C. metallidurans* CH34 était connue pour ses capacités de résistance aux métaux par des systèmes d'efflux (Mergeay et al., 1987; Rozycki and Nies, 2008), on peut supposer qu'une grande partie des métaux retenus en conditions passives d'exposition, notamment dans le cytoplasme, soit expulsée des cellules par ce mécanisme, expliquant ainsi les fortes différences observées avec des cellules inactives.

Concernant la surproduction d'EPS, on a vu qu'il existait deux types d'EPS chez les bactéries, les EPS liés et solubles :

Si les bactéries avaient synthétisé des EPS liés pour se protéger des métaux, on observerait une augmentation de l'adsorption membranaire comme le montrent différentes études (Bhaskar and Bhosle, 2006; Comte et al., 2006a; Ueshima et al., 2008; Bunge et al., 2010; Ha et al., 2010). Pour *C. metallidurans* CH34 les quantités de métaux dans le compartiment membranaire sont généralement plus faibles en conditions actives d'exposition, laissant penser qu'il n'y a pas de surproduction de polymères liés pendant la croissance cellulaire en présence de métaux. En revanche, avec les cellules de *E. coli* K12Dh5a mises en contact avec  $10^{-4}$  M de Zn, on observe une augmentation significative ( $\times 2.3$ ) de la quantité de Zn dans le compartiment membranaire, ce qui indique que cette bactérie est capable de synthétiser des polymères liés afin d'augmenter sa densité de sites réactifs de surface et ainsi retenir les métaux à l'extérieur de la cellule.

Les bactéries sont également connues pour leur capacité à synthétiser des EPS solubles qui vont « inerte » les métaux directement dans le milieu extérieur et diminuer la concentration biodisponible (Mirimanoff and Wilkinson, 2000; Smiejan et al., 2003). Smiejan et al. (2003) ont montré que la bactérie *Rhodospirillum rubrum* excrète en quelques minutes un fort ligand complexant en présence de Cd ( $5 \times 10^{-6}$  M). De même, Mirimanoff and Wilkinson (2000) ont mis en évidence la production d'un ligand dans le milieu extracellulaire par des cellules de *Rhodococcus opacus* en réponse à la présence de Zn ( $5 \times 10^{-6}$  M). Kassab and Roane (2006) ont également montré la production de polymères par deux espèces de *Pseudomonas* sp. en contact avec du Cd ( $10^{-6}$  M). Les images obtenues en microscopie électronique (paragraphe II-3) indiquaient qu'en conditions actives d'exposition au Cd, les cellules de *C. metallidurans* CH34 produisent dans le milieu extracellulaire des nanogranules riches en phosphate et cadmium, ce qui peut correspondre à une forme d'inertage du Cd, bien que nous n'ayons pu le confirmer par la suite. De nouvelles analyses devraient permettre de valider cette surproduction de polymères riches en phosphate comme mécanisme de résistance au Cd par cette bactérie. Il serait également intéressant de pouvoir mesurer les concentrations de métaux libres dans le milieu extracellulaire à l'aide d'une électrode sélective ou de « Hollow Fiber Permeation Liquid Membrane » (HF-PLM) (Parthasarathy et al., 1997; Slaveykova et al., 2009). Cette information permettrait de mieux caractériser la spéciation du cadmium et pourrait confirmer la présence d'efflux cellulaire. En effet, la spéciation des métaux est un facteur connu pour contrôler les interactions entre les métaux et les microorganismes, et notamment leur biodisponibilité (Sigg and Behra, 2005).

Des dosages de protéines et de sucres dans le milieu extracellulaire et associés aux cellules ont été réalisés afin de vérifier leur implication dans la prise en charge des métaux. Pour *C. metallidurans* CH34, nous avons pu observer une augmentation significative de la quantité de protéines associées aux cellules en présence de métal, d'autant plus importante que le métal est toxique et fortement concentré. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que pour se protéger des métaux, les cellules synthétisent des protéines, par exemple des transporteurs pour l'efflux ou bien des polymères protéiques liés aux cellules pour augmenter la densité des sites réactifs de surface (Bhaskar and Bhosle, 2006; Ha et al., 2010). D'après les résultats de distribution subcellulaire, l'augmentation de la quantité de protéines semblerait plutôt due à une augmentation des transporteurs car on observe une diminution de la quantité de Cd biosorbé et une augmentation du Cd extracellulaire probablement dû à un mécanisme d'efflux.

Pour *E. coli* K12Dh5α on observe une augmentation de la production de sucres associés aux cellules et une augmentation des protéines extracellulaire en présence de Cd. Cette augmentation de la teneur en sucres est probablement due à une surproduction de sucres (polysaccharides) à la surface des cellules (mucus) pour se protéger de la toxicité du Cd. En effet, les exopolysaccharides sont capables de retenir fortement les métaux et donc de limiter leur entrée dans les cellules. Ce type de mécanisme est connu comme une stratégie de résistance bactérienne consistant à augmenter la densité de sites de fixation à la surface des cellules et permettant de piéger les métaux en dehors du cytoplasme (Bhaskar and Bhosle, 2006). L'augmentation de la quantité de protéines dans le milieu extracellulaire pourrait être le résultat de la production d'EPS libres produit par les cellules afin d'inertiser les métaux à l'extérieur et ainsi limiter leur toxicité.

Les résultats obtenus montrent que conformément à la littérature, les cellules de *C. metallidurans* CH34 se protègent de la toxicité des métaux en mettant en place des mécanismes d'efflux qui lui permettent de limiter les quantités de métaux intracellulaires (Mergeay et al., 1987; Rozycki and Nies, 2008). Concernant *E. coli* K12Dh5α, les différences observées entre les deux types d'exposition montrent également que les cellules actives sont capables de limiter les quantités de métaux dans le cytoplasme, grâce à des mécanismes d'efflux mais aussi en limitant l'entrée des métaux dans la cellule par surproduction d'EPS, qui agissent alors comme une barrière protectrice.

### **III-4-3. Biosorption et distribution subcellulaire du zinc et du cadmium en mélange dans les cellules de *Escherichia coli* K12Dh5α et *Cupriavidus metallidurans* CH34**

Les résultats obtenus lors de cette étude concernant la distribution du Cd et du Zn en mélange ont montré qu'il ne semblait pas y avoir d'effet mélange particulier pour *C. metallidurans* CH34. En effet on observe peu de différences sur les quantités de Cd et de Zn bioaccumulés lorsqu'ils sont seuls ou en mélange. On peut donc penser que la prise en charge du Cd et du Zn par les cellules de *C. metallidurans* CH34 a lieu quelles que soient la composition et les concentrations en métaux dans l'environnement cellulaire. De plus l'absence de compétition entre le Zn et le Cd pour les sites de sorption pourrait indiquer que les sites et/ou mécanismes de rétention du Cd ne sont pas les mêmes que ceux du Zn. Le Cd est probablement pris en charge par d'autres systèmes de transporteurs chez *C. metallidurans* CH34, notamment ceux du magnésium, du calcium et du manganèse comme cela a déjà été décrit (Nies, 1999; Haferburg and Kothe, 2007), expliquant ainsi les résultats obtenus sur les distributions du Cd et du Zn en mélange lors de cette étude. En revanche, avec des cellules actives, les résultats montrent que la présence de Zn diminue les quantités totales de Cd

bioaccumulé, ainsi que les quantités sorbées aux membranes et internalisées. Inversement, la présence de Cd diminue la bioaccumulation du Zn en conditions de mélange. Ces observations confirment les résultats observés lors des suivis de croissance des cellules en présence de métaux qui montrent que les cellules de *C. metallidurans* CH34 ne sont pas affectées par la présence des métaux, qu'ils soient seuls ou en mélange.

Concernant *E. coli* K12Dh5 $\alpha$ , on note une meilleure croissance des cellules en présence du mélange Zn et Cd qu'avec le Cd seul ( $10^{-5}$ M) indiquant un effet de la présence du Zn sur la détoxification du Cd par les cellules de *E. coli* K12Dh5 $\alpha$ . Les résultats obtenus pour *E. coli* K12Dh5 $\alpha$  peuvent s'expliquer par un effet de compétition du Cd pour les sites de sorption du Zn sur les membranes cellulaires mais aussi dans le cytoplasme puisque le Cd utilise les mêmes transporteurs que *E. coli* K12Dh5 $\alpha$  (Laddaga and Silver, 1985; Smiejan et al., 2003). En effet, comme décrit dans le chapitre I, le métabolisme bactérien du Zn et du Cd est très proche. Il a été montré que chez *E. coli* le Cd rentre dans la cellule via les systèmes de transport du Zn (Laddaga and Silver, 1985; Hao et al., 1999). De plus, ces deux métaux sont détoxifiés par des systèmes de transporteurs identiques, notamment le système *czd* (Nies, 1999, 2003). Un effet synergique de la présence du Zn sur l'induction des systèmes de résistance et donc de détoxification du Cd est donc très probable.

Il existe peu d'études sur la bioaccumulation de mélanges de métaux par les microorganismes. Tunali et al. (2006) ont montré que chez *Bacillus sp.*, il existe une compétition entre le Pb et le Cu qui entraîne une diminution des quantités de métal biosorbées en conditions de mélange. De même Li et al. (2004) ont montré que les capacités de biosorption du Cd et du Pb par un champignon, *Phanerochaete chrysosporium*, étaient diminuées en conditions de mélange. Plette et al. (1996) ont montré que la présence de Zn dans la solution réduit d'un facteur 3 à 4 la sorption du Cd sur les cellules de *Rhodococcus erythropolis* A177. Choi and Park (2005) ont montré que la biosorption du nickel, qui est généralement faible, est fortement diminuée en présence d'autres métaux (U, Pb, Cd et Zn). D'après les auteurs, ce résultat suggère que certains métaux peuvent présenter une réduction significative de leur assimilation en présence d'un autre métal, tandis que la capacité d'assimilation du second élément (le co-ion) n'est pas significativement affectée, comme observé lors de notre étude avec *E. coli* K12Dh5 $\alpha$ . Açıkel and Alp (2009) ont montré que chez le champignon *Rhizopus delemar*, il existe une compétition entre le Ni et le Cu qui entraînait une diminution des quantités de métal biosorbés en conditions de mélange par rapport aux mono expositions. La raison la plus logique à ce résultat est la compétition entre les deux métaux pour la complexation et la sorption aux sites de surface et/ou pour la bioaccumulation intracellulaire (Açıkel and Alp, 2009). Bien que les quantités de Cu et de Ni bioaccumulés soient diminuées en conditions de mélange comparé aux mono expositions, les auteurs ont noté, comme lors de notre étude, que la quantité totale de métal bioaccumulée, c'est-à-dire la somme de Cu et Ni, étaient supérieure aux quantités de métal bioaccumulées avec chaque métal seul. Dans ce cas l'effet combiné du Ni et du Cu est plutôt synergique (Açıkel and Alp, 2009). Une explication possible de la synergie observée est qu'il peut exister des sites de sorption à la surface des cellules qui sont spécifiques d'un métal et pour lesquels il n'y a pas de compétition (Açıkel and Alp, 2009).

A notre connaissance, il n'existe pas de canaux de transport spécifique pour le Cd chez les bactéries. L'entrée du Cd dans la cellule se fait donc par les canaux non spécifiques ou par les transporteurs de métaux essentiels comme le Zn, Ca, Mg ou Mn (Nies, 1999). La présence « d'ions compétiteurs » dans le milieu devrait donc diminuer la bioaccumulation de métal toxique (Slaveykova et al., 2009). Les résultats obtenus pour *E. coli* K12Dh5 $\alpha$  sont en accord avec cette hypothèse. Par extraction chimique à l'EDTA, Slaveykova et al. (2009) ont montré que chez *Sinorhizobium meliloti* il n'y a pas de différence significative de l'adsorption membranaire du Cd en présence ou en absence de Zn. En revanche l'accumulation



intracellulaire du Cd est fortement diminuée en présence de Zn, les auteurs ont noté 3.5 fois moins d'accumulation de Cd pour une augmentation de 10 fois en Zn et 20 fois moins d'accumulation pour une augmentation de 100 fois en Zn. Nos résultats sont en accord avec ces observations pour *E. coli* K12Dh5α. « L'effet compétition » est fortement dépendant des ions compétiteurs. Dans leur étude, l'accumulation intracellulaire du Cd est fortement limitée par la présence de Zn ou Ca, faiblement limitée par la présence de Mn et pas du tout modifiée par la présence de Mg. Concernant l'adsorption membranaire du Cd, ils ont observé une forte diminution de la bioaccumulation du Cd sur les membranes en présence de Ca, un faible effet en présence de Mg et pas d'effet significatif en présence de Mn et Zn. Ces résultats suggèrent que le principal moyen d'entrée du Cd dans les cellules de *Sinorhizobium meliloti* se fait probablement via les transporteurs de Ca et Zn. Smiejan et al. (2003) ont montré une inhibition de l'accumulation du Cd en présence de Zn chez la bactérie *Rhodospirillum rubrum*, et inversement une augmentation de l'accumulation du Cd en présence de cuivre et de manganèse. Laddaga and Silver (1985) ont montré que, chez *E. coli*, le zinc est un inhibiteur de l'incorporation du Cd, comme observé dans notre étude. Ces résultats indiquent que chez *E. coli* le cadmium est activement accumulé par les systèmes de transporteurs du zinc (Laddaga and Silver, 1985) et confirment ainsi les résultats obtenus lors de cette étude.

### III-5. Conclusion

Les travaux présentés dans ce chapitre ont permis de valider notre protocole de fractionnement physique de cellules bactériennes pour l'étude de la distribution subcellulaire des métaux chez les bactéries. En effet les différentes conditions testées sont conformes aux données obtenues par des techniques classiques (isothermes de sorption par exemple) et valident les hypothèses formulées.

Cette étude montre que les cellules inactives des deux bactéries modèles à Gram négatif sont capables de bioaccumuler des quantités importantes de Cd et de Zn (jusqu'à 50% du métal présent en solution). Nos résultats montrent de manière étonnante que cette bioaccumulation se fait surtout au niveau intracellulaire pour les deux bactéries, en désaccord avec les concepts classique de biosorption membranaires des métaux. Le compartiment membranaire semble jouer un rôle mineur dans la bioaccumulation et peut donc être considéré comme une simple porte d'accès des métaux au cytoplasme. On a également observé que les deux bactéries interagissent différemment avec les deux métaux modèles, *C. metallidurans* CH34 semblant bioaccumuler de plus grandes quantités de Cd et de Zn en conditions passives d'exposition par rapport à *E. coli* K12DH5α.

L'une des originalités de ce travail a été de comparer l'effet de l'état physiologique des cellules sur la distribution subcellulaire des métaux. Lorsque les cellules se développent activement en présence de métaux, elles sont capables de les prendre en charge pour se protéger en activant des mécanismes de résistance spécifiques. Les deux types de cellules étudiées lors de cette étude présentent des mécanismes de détoxification du Cd et du Zn proches. En effet, il apparaît que les deux bactéries sont capables de limiter l'accumulation de métaux intracellulaires soit par des mécanismes d'efflux, bien connus chez *C. metallidurans* CH34, soit par des mécanismes de séquestration dans le milieu extracellulaire sous forme dissoute ou complexée à des polymères, synthétisés par les cellules en réponse à la présence des métaux. En terme de bioremédiation, on note que, pour ces deux bactéries, des cellules inactivées semblent plus efficaces pour la biosorption de métaux que des souches métaboliquement actives, capables de limiter la bioaccumulation des métaux.

Une autre originalité de cette étude a été d'étudier la présence d'un métal compétiteur sur la distribution subcellulaire des métaux. Les résultats ont montré que la bioaccumulation

du Cd et du Zn par les cellules de *C. metallidurans* CH34 n'est pas significativement affectée par la présence de métal compétiteur quelles que soient les conditions d'expositions (passives ou actives). Ces résultats indiquent que les métabolismes du Cd et du Zn sont différents chez *C. metallidurans* CH34 et que les concentrations étudiées ne sont pas suffisamment élevées pour produire des effets croisés. Chez cette bactérie, la régulation du Cd se fait principalement par les transporteurs de Ca, Mg et/ou Mn. (Nies, 1999; Haferburg and Kothe, 2007) et explique qu'il n'y ait pas d'effet antagoniste ou synergique entre le Cd et le Zn sur leur sorption et leur assimilation intracellulaire en conditions de mélange. En revanche, la bioaccumulation du Cd par les cellules de *E. coli* K12DH5 $\alpha$  s'est avérée fortement affectée par la présence de Zn dans le milieu. Ceci se caractérisant par une forte diminution des quantités de Cd sorbées aux membranes et internalisées, pour les deux conditions d'expositions (cellules actives / inactives), et inversement la présence de Cd diminue fortement la bioaccumulation de Zn en conditions de mélange. Ces résultats indiquent que les métabolismes du Cd et du Zn chez *E. coli* K12DH5 $\alpha$  sont fortement liés comme déjà décrit dans la littérature (Laddaga and Silver, 1985). De plus ces résultats montrent que d'une manière générale, la présence de métal compétiteur entraîne une diminution de la bioaccumulation par rapport à une mono exposition indiquant un effet antagoniste du co-ion. En mélange, la quantité totale de métaux biosorbés est supérieure à la quantité totale de métaux bioaccumulés en mono-exposition, indiquant un effet synergique du mélange sur les quantités de métaux bioaccumulés (Açikel and Alp, 2009).

Nos résultats montrent donc que la réactivité des bactéries à Gram négatif avec les métaux dépend beaucoup de leur état physiologique, actif ou inactif, de la nature et de la concentration des métaux, ainsi que de la présence d'ions compétiteurs. On peut donc s'attendre à ce que les conditions du milieu contrôlent fortement la biosorption des métaux par les bactéries, via des processus de compétition (affinité pour les sites réactifs) ou de résistance active (efflux et inertage externe).



## **CHAPITRE IV     Etude du transfert de bactéries en colonne de laboratoire**



## **IV-1. Introduction**

Le transport et la rétention des bactéries dans les milieux poreux sont des phénomènes complexes et d'un intérêt significatif dans un but de protection des eaux de surface des bactéries pathogènes et également pour améliorer les procédés de bioremédiation (Ginn et al., 2002; Redman et al., 2004; Kim et al., 2009). Il apparaît donc important de mieux comprendre les mécanismes de transport des bactéries. Beaucoup de travaux se sont intéressés principalement aux facteurs physicochimiques qui influencent le transport des bactéries mais il existe encore peu de connaissances concernant l'influence des facteurs biologiques (Fontes et al., 1991; Bradford et Bettahar, 2006; Park et al., 2010). En effet, comme pour les colloïdes inorganiques, le transport et le dépôt des bactéries dans les milieux poreux sont influencés par les propriétés propres au milieu poreux telles que la charge de surface, la taille et la forme des grains. La chimie de la solution joue aussi un rôle prépondérant, notamment par le pH et la force ionique. Plusieurs études ont pu montrer que le transport et la rétention des cellules bactériennes étaient également influencés par des caractéristiques propres aux cellules telles que la géométrie des cellules, leur charge de surface, la motilité cellulaire, la présence de polymères ou l'hydrophobie de surface.

Les principaux facteurs qui affectent la rétention de bactéries dans les milieux poreux sont le straining et les phénomènes d'adsorption des bactéries sur la matrice (Ginn et al., 2002). Le straining correspond à la rétention physique des bactéries lorsque les pores sont de plus petites tailles que les bactéries. Ce mécanisme est contrôlé principalement par la taille des grains de la matrice, la forme et la taille des bactéries et les propriétés hydrauliques du système (Stevik et al., 2004). L'adsorption est le mécanisme majeur de la rétention des bactéries quand les pores sont plus grands que les cellules. C'est un processus en 2 étapes. On observe tout d'abord une adsorption réversible de faible interaction avec la matrice (dans le second minimum d'énergie), suivi d'une adsorption irréversible à la matrice, également appelé adhésion, impliquant de fortes énergies de liaisons (Stevik et al., 2004). L'adsorption est influencée par des facteurs physiques (milieu poreux, présence de matière organique, température et vitesse du fluide), chimiques (force ionique, valence des ions et pH) et biologiques (hydrophobicité, chimiotaxie, charge de surface, constituants de surface, concentration cellulaire).

La charge de surface des cellules estimée par le potentiel zêta est généralement corrélée avec les taux de rétention. Les cellules les plus électronégatives sont moins retenues (Sharma et al., 1985; Haznedaroglu et al., 2009). D'autres facteurs tels que le type cellulaire, les interactions hydrophobes et la composition de la surface (présence de LPS, EPS...) sont également reconnus pour influencer le transport des bactéries (Redman et al., 2004). Malgré toutes ces études les mécanismes qui gouvernent le transport des bactéries ne sont toujours pas bien compris car rendus complexes par le fait que les propriétés biologiques sont souvent dépendantes des propriétés physicochimiques du milieu et nécessitent alors une étude au cas par cas.

Dans les systèmes naturels, les cellules et la matrice ont généralement des surfaces négativement chargées ce qui, d'après la théorie DLVO conduit à des forces répulsives. Malgré ces conditions défavorables au dépôt, plusieurs études montrent que les bactéries sont souvent retenues. Certains chercheurs expliquent ces phénomènes par des hétérogénéités de surface des grains de la matrice (Truesdail et al., 1998). Meinders (1995) suggère que le dépôt des cellules bactériennes se fait dans le second minimum d'énergie. En effet bien qu'uniforme en taille, les grains de sable présentent des hétérogénéités chimiques qui influencent la rétention des bactéries en créant des régions favorables à l'adhésion (Meinders, 1995). Torkzaban et al. (2008) ont également montré l'importance de la géométrie du milieu poreux

pour expliquer les phénomènes de rétention bactérienne. Au sein du milieu il existe des zones immobiles où les flux d'eau sont nuls et où les bactéries peuvent alors se retrouver piégées. La force ionique et le pH de la solution sont également connus pour affecter fortement la mobilité des bactéries. Enfin, des recherches récentes ont montré que ces approches classiques basées sur la théorie DLVO ne sont pas toujours valides pour prédire les interactions entre les bactéries et la matrice à cause de la présence de couche de polymères complexes qui s'étendent dans la solution. Selon la force ionique, la présence de substances polymériques peut en effet modifier l'adhésion des cellules par interactions électrostatiques (Kim et al., 2009).

Un autre facteur important et relativement peu étudié est la prise en compte de l'effet de la concentration cellulaire. Peu d'études se sont intéressées à l'effet de la concentration des bactéries sur leur transport alors qu'il a été montré que ce facteur peut fortement influencer le transport des colloïdes (Camesano et Logan, 1998; Camesano, 1999; Guiné, 2006; Bradford et al., 2009; Haznedaroglu et al., 2009; Jansen et al., 2010). On considère qu'il existe 2 cas possibles : soit l'augmentation de la concentration entraîne une augmentation de la rétention des colloïdes (effet ripening), soit à l'inverse l'augmentation de la concentration entraîne une diminution de la rétention (effet blocking). Plusieurs études ont montré que l'augmentation de la concentration de bactéries injectées entraîne une diminution de la rétention (Camesano et Logan, 1998; Guiné, 2006; Haznedaroglu et al., 2009; Jansen et al., 2010). Haznedaroglu et al. (2009) ont étudié l'effet de la concentration cellulaire sur le transport de deux bactéries. Les auteurs n'ont pas observé d'effet concentration entre  $5 \cdot 10^6$  et  $10^7$  cellules.mL<sup>-1</sup>. En revanche, pour une concentration initiale de  $10^8$  cellules.mL<sup>-1</sup>, ils ont observé une augmentation du bilan de masse (environ 20%) pour les deux souches. Ces résultats peuvent s'expliquer par un effet blocking, bien que ce mécanisme soit non cohérent avec les formes de courbes de percée obtenues. Les auteurs ont alors suggéré des phénomènes de collisions entre les cellules qui remobilisent les bactéries faiblement retenues. En revanche il existe peu d'études qui ont montré une augmentation de la rétention avec l'augmentation de la concentration initiale de cellules injectées. Par exemple, Camesano and Logan (1998) ont observé un effet ripening chez une bactérie en relation avec sa motilité.

Enfin, très peu d'études, seulement 2 à notre connaissance, se sont intéressées à l'effet de la présence de plusieurs types de bactéries. Dong et al. (2002) ont réalisé des études de transport de mélange de deux bactéries et ont montré que la présence des deux souches entraînait une augmentation de leur dépôt par rapport au cas où elles étaient seules. Stumpp et al. (2011) ont étudié les effets de mélange avec trois souches bactériennes. Les résultats montrent que l'effet mélange est dépendant de la souche. En effet, *Burkholderia cepacia* G4PR1 ne s'est pas avérée influencée par la présence d'autres bactéries, alors que la présence d'autres bactéries entraîne une augmentation du dépôt de cellule de *Klebsiella oxytoca*. Inversement, la présence d'autres bactéries entraîne une diminution du dépôt de cellules de *Pseudomonas.sp.*

Dans ce chapitre, nous avons étudié le transport des deux bactéries modèles à Gram négatif dans le sable d'Hostun HN34, milieu poreux relativement simple composé à plus de 98% de silice, afin de caractériser les mécanismes de transport des cellules bactériennes dans la matrice avant d'étudier le transport facilité des métaux par les bactéries. Toutes les expériences ont été réalisées dans des conditions physicochimiques constantes, à pH 6 et dans de l'eau distillée, afin de comparer l'effet des facteurs biologiques entre les deux cellules. Nous nous sommes placés dans des conditions où les cellules bactériennes et la matrice sont chargées négativement, conditions théoriquement défavorables aux interactions des cellules avec la matrice. L'originalité de ce travail réside dans l'utilisation de la cytométrie en flux pour l'énumération des bactéries, notamment à faible concentration, dans les effluents de colonne. Cette technique analytique puissante nous a permis d'étudier d'une part l'effet de la

concentration cellulaire sur le transport bactérien, avec des gammes de concentration étalées et d'autre part le transport de bactéries en mélange en colonne de sable naturel réactif.

## IV-2. Matériel et méthodes

### IV-2-1. Les bactéries modèles

Les deux bactéries modèles utilisées pour l'étude du transfert réactif de cellules bactériennes sont *Cupriavidus metallidurans* CH34 et *Escherichia coli* K12DH5 $\alpha$ . Au vu des fortes capacités de résistance aux métaux lourds de *C. metallidurans* CH34, cette bactérie est un bon candidat pour des tests de bioremédiation des sols pollués aux métaux lourds. *E. coli* K12DH5 $\alpha$  est un bon témoin, de part sa plus forte sensibilité aux métaux lourds et par ses facilités de culture.

### IV-2-2. Le milieu poreux modèle : le sable d'Hostun HN34

Le milieu poreux utilisé pour cette étude est le sable d'Hostun de qualité HN34 fourni par la société SIKA (Sifrako). Les caractéristiques techniques complètes du sable d'Hostun (données du fournisseur) sont présentées en Annexe 4.

#### IV-2-2-1. Propriétés chimiques du sable d'Hostun

D'après la fiche technique du fournisseur, ce sable est composé à plus de 98% de silice, les 2% restant étant des oxydes métalliques (Tableau IV-1). De plus le fournisseur indique une perte au feu à 1000°C de 0.15%. Des analyses effectuées au laboratoire à 500°C ont montré une perte au feu de l'ordre de 0.10%  $\pm 0.02$ . Ce pourcentage est supposé correspondre à la teneur massique en matière organique.

**Tableau IV-1: Composition chimique du sable d'Hostun HN34.**

SiO <sub>2</sub>	> 98%
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	< 0.15%
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	< 1.0 %
K <sub>2</sub> O	< 0.7%
CaO	< 0.1%

Le pH du sable commercial étant proche de 8, le sable a été lavé pendant 48h dans une solution d'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) 1M puis rincé dans de l'eau distillée à plusieurs reprises jusqu'à obtenir un pH final proche de 6 pour correspondre au pH utilisé lors des expériences présentées dans les chapitres II et III.



### IV-2-3. Méthodes analytiques pour la quantification des bactéries dans les effluents de colonne

#### IV-2-3-1. Mesure de la densité optique à 600nm

Les effluents de colonne sont systématiquement analysés en spectrophotométrie optique à une longueur d'onde de 600nm comme présenté dans le chapitre III.

#### IV-2-3-2. Quantification par cytométrie en flux

Comme vu précédemment, dans le chapitre III, les résultats de mesures de concentrations cellulaires obtenues par cytométrie sont bien corrélés à ceux obtenus par les techniques de dénombrement indirect par culture. Nous avons donc choisi d'utiliser la CMF pour la détection des bactéries en sortie de colonne. L'intérêt de ce type d'analyse pour le suivi du transfert de bactéries en colonne est de pouvoir détecter les cellules bactériennes modèles par fluorescence, exprimée de manière constitutive (gfp ou yfp) ou par l'utilisation de fluorochromes exogènes réagissant spécifiquement avec l'ADN :

- Nous avons testé au laboratoire une souche de *E. coli* K12DH5 $\alpha$  génétiquement modifiée et portant le plasmide GFP (Green Fluorescent Protein) ou le plasmide YFP. (Yellow Fluorescent Protein). Des tests préliminaires nous ont permis de choisir la souche portant le gène YFP comme modèle, car les longueurs d'onde de la protéine yfp permettent une détection optimale des cellules au cytomètre (sur le mode FL1) contrairement à la protéine gfp.
- Nous avons ensuite essayé de transformer la bactérie *C. metallidurans* CH34 avec le plasmide yfp mais sans succès. Nous avons donc travaillé par la suite avec des cellules de *C. metallidurans* CH34 marquées avec un fluorochrome exogène avant ou après le passage dans la colonne. Différents essais ont été menés avec des fluorochromes spécifiques des acides nucléiques :

Des tests ont été réalisés en utilisant les marqueurs « SYTO® 9 green et SYTO® 62 red fluorescent nucleic acid stain » fourni par la société Invitrogen. Ce sont des fluorochromes qui se fixent sur les acides nucléiques. Les spectres d'émission et d'excitation du Syto9 et du Sytored62 sont détectables par le laser bleu et le laser rouge, respectivement, du cytomètre C6 d'Accuri (Figure IV-1). On peut les visualiser en mode FL1 et FL4 du cytomètre, respectivement.

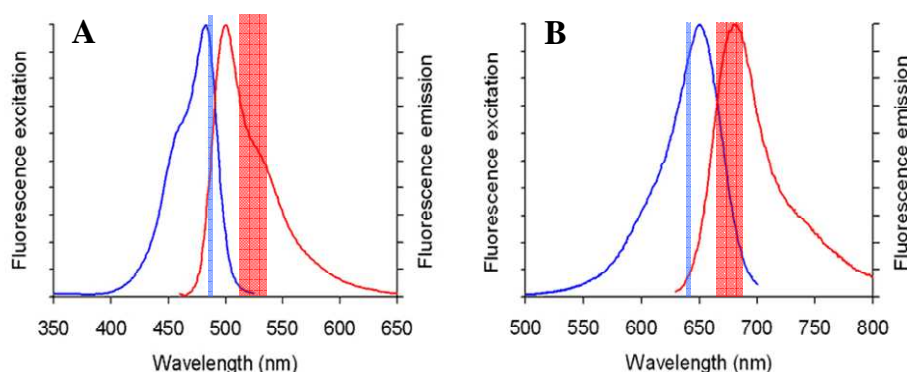


Figure IV-1 : Spectres d'excitation (bleu) et d'émission (rouge) du SYTO9 et du SYTOred 62 (données invitrogen). Les barres représentent les longueurs d'ondes caractéristiques du cytomètre en flux C6 d'Accuri.

L'avantage du Sytored est qu'il est détecté sur le laser rouge du cytomètre et ne présente donc pas d'interférence avec le laser bleu, ce qui permet de différencier facilement les cellules marquées au Sytored de celles détectées avec le laser bleu (marquage au SYTO9 ou yfp), ce qui nous intéresse particulièrement dans le cas de l'étude du transfert de bactéries en mélange.

En pratique, des tests ont été réalisés en appliquant les fluorochromes sur les cellules bactériennes récoltées en sortie de colonne au cours de l'expérience de transfert. Dans ce cas, 1µl de fluorochrome de la solution commerciale diluée 10 fois a été ajouté à 200µl d'échantillon préalablement dilué à la concentration souhaitée. Le mélange est placé 15 minutes à l'obscurité avant analyse. Des tests ont également été réalisés en colorant les cellules bactériennes avec les fluorochromes avant les essais de transfert en colonne. Dans ce cas, après culture en milieu LB, les cellules sont récoltées par centrifugation (5000g, 10min) puis rincées trois fois dans de l'eau distillée. Les cellules sont alors mises en contact 15 minutes avec le fluorochrome: 50µl de fluorochrome dilué 10 fois pour 40ml de culture à la concentration souhaitée pour l'expérience. Les suspensions sont alors rincées trois fois à l'eau distillée afin d'éliminer l'excès de fluorochrome dans la solution. Ensuite les expériences de transfert se déroulent comme présenté ci-après et les cellules bactériennes sont énumérées directement dans les effluents de colonne sans traitement particulier.

#### **IV-2-4. Etude en colonnes de laboratoire**

##### **IV-2-4-1. Principe des études de transfert en colonnes de laboratoire**

L'approche développée dans cette étude est une approche de dynamique des systèmes basée sur l'utilisation de colonnes de laboratoire permettant l'étude monodimensionnelle du transport de solutés ou de particules dans des conditions physiques et chimiques rigoureusement contrôlées (volume et densité sèche du milieu poreux, débit d'injection, teneur en eau, solutions d'injection,...). Le principe expérimental consiste en l'injection d'un signal (colloïdes, traceur, métaux...) selon une fonction d'entrée connue (dans notre cas un créneau de concentration) dans une colonne remplie d'un milieu poreux, et ensuite à analyser la réponse en sortie ou courbe de percée. Le signal d'entrée est un créneau de soluté ou de particules, de concentration  $C_0$  et de durée  $\delta t$ . La concentration de soluté en sortie de colonne en fonction du temps est souvent appelée courbe d'élution du soluté, ou courbe de percée. La comparaison de la forme du signal de sortie et du signal d'entrée, ainsi que l'analyse des temps de séjour et des bilans de masse, permet d'identifier et de quantifier les phénomènes impliqués dans le transport et la rétention du soluté ou des particules au cours de leur transfert dans la matrice poreuse.

##### **IV-2-4-2. Mise en place du dispositif expérimental**

Le dispositif expérimental est présenté sur la Figure IV-2. Le remplissage du sable dans les colonnes (Amersham Ltd., London, UK) se fait par l'intermédiaire d'un tube de métal muni de deux grilles de 2 mm à mailles perpendiculaires, un écart constant est maintenu entre la base du tube et le sommet du sable de façon à garantir une énergie cinétique constante des grains de sable et donc un remplissage homogène sur toute la hauteur et la section de la colonne (Martins & Mermoud 1998, 1999). Le régime permanent d'écoulement d'eau est installé avant le démarrage des expériences. Le débit est maintenu constant grâce à une pompe péristaltique qui alimente en solution le bas de la colonne. Cela permet de limiter le colmatage des pores capillaires par des particules soumises à la gravité et le piégeage de bulles d'air. Le

lavage du sable se fait au cours de la saturation de la colonne. En sortie de colonne, les effluents sont recueillis avec un collecteur de fractions (Gilson 203). L'analyse de ces échantillons permet de tracer les courbes de percée et de vérifier la constance du débit après analyse. La détermination des volumes écoulés et du volume poral se fait par pesée, en supposant que la masse volumique des solutions injectées est celle de l'eau.

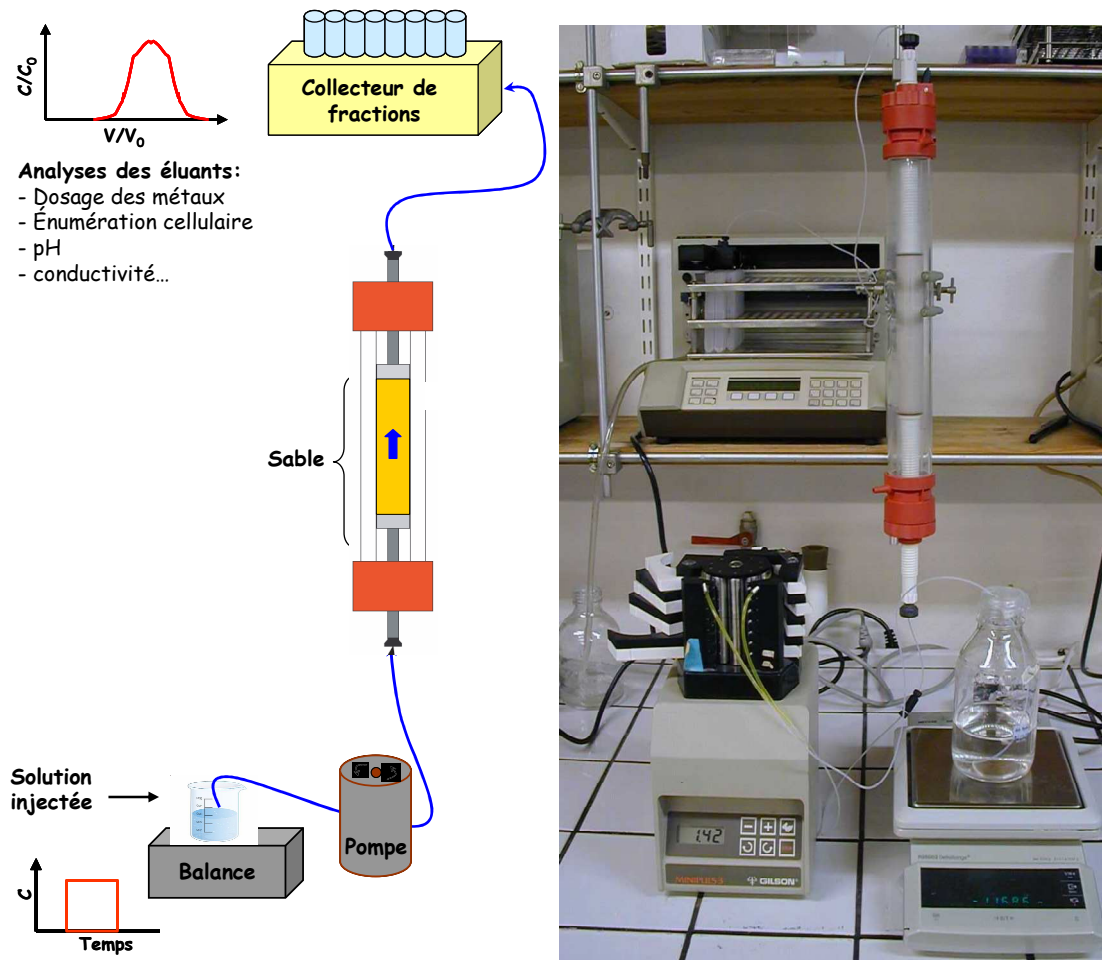


Figure IV-2: Schéma et photographie du dispositif expérimental de transfert de bactéries et de métaux en colonne de laboratoire.

Lors de cette étude les caractéristiques des colonnes de sable d'Hostun ont été maintenues constantes dans la mesure du possible :

- diamètre des colonnes : 2,6 cm ;
- hauteur de sable :  $15,0 \pm 0,3$  cm ;
- volume de la colonne :  $79,6 \pm 2,7$  cm<sup>3</sup>
- masse de sable :  $120 \pm 2$  g ;
- masse volumique apparente sèche :  $1,54 \pm 0,04$  g cm<sup>-3</sup>
- porosité :  $0,42 \pm 0,2$  ;
- volume poral (saturation) :  $33 \pm 2$  ml
- débit d'alimentation ( $Q$ ) :  $10,0 \pm 0,5$  ml h<sup>-1</sup>
- vitesse d'écoulement ( $v$ ) :  $5,0 \pm 0,3$  cm h<sup>-1</sup>

Afin d'éviter les problèmes liés au passage répété de solutés ou particules dans une même colonne (historique des injections, rétention irréversible...), il a été décidé de préparer systématiquement une colonne par essai. Cette approche permet d'obtenir des résultats non affectés par l'historique de passage de divers solutés ou particules qui peuvent être retenus dans la colonne et modifier par la suite leur comportement. Les expériences décrites dans le Chapitre V et menées avec les polluants métalliques seront réalisées dans les mêmes conditions que pour l'étude du transfert des colloïdes bactériens.

#### IV-2-4-3. Profils de rétention des cellules bactériennes dans la colonne

En plus de l'analyse des courbes d'élution, on détermine les quantités de cellules retenues dans la colonne en fin d'expérience. Pour cela, le sable est extrait de la colonne puis découpé en 7 tranches d'environ 2 centimètres. Chaque section est ensuite broyée 2 fois pendant 20 secondes au Waring blender dans 50 mL d'eau stérile. Le surnageant est mis à décanter, prélevé puis dilué afin de procéder à un dénombrement bactérien sur boîte de Petri ou en microscopie à épifluorescence (paragraphe III-2-3). La quantité de cellules extraites est rapportée à la quantité de sable dans chaque fraction et les profils de rétention sont exprimés en nombre de cellules par gramme de sable sec en fonction de la profondeur dans la colonne (cm).

#### IV-2-4-4. Etude des caractéristiques du transport de bactéries par modélisation inverse

Afin de modéliser le transfert réactif des cellules bactériennes, nous avons utilisé le logiciel STANMOD (STudio of ANalitical MODEls) qui a été développé par une équipe de l'US Salinity Laboratory (Simunek et al., 1999). Il s'agit d'un logiciel gratuit qui inclut la version 2.0 de CXTFIT (Toride et al., 1999). Il propose une solution analytique mono dimensionnelle de l'équation de convection-dispersion pour certaines conditions. STANMOD utilise l'algorithme de Marquardt-Levenberg (Marquardt, 1963) pour effectuer la résolution inverse. Le code CXTFIT calcule une solution analytique de l'équation de transport convection dispersion (CDE) avec éventuellement des termes de dépôts réversible et irréversible linéaire. Ainsi, à partir de l'équation de convection dispersion, on peut prendre en compte ces deux types d'interactions en introduisant des termes d'adsorption réversible et irréversible, on obtient ainsi, le modèle suivant :

$$\frac{\partial C_{aq}}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_{aq}}{\partial z^2} - \frac{q}{\theta} \frac{\partial C_{aq}}{\partial z} - \frac{\partial F_{rev}}{\partial t} - \frac{\partial F_{irr}}{\partial t} \quad \text{Eq. IV-1}$$

avec  $C_{aq}$  (UFC L<sup>-3</sup>) : la concentration de cellules en phase aqueuse ;  $D$  (L<sup>2</sup> T<sup>-1</sup>) : le coefficient de dispersion hydrodynamique ;  $q$  (L T<sup>-1</sup>) : la vitesse de Darcy et  $\theta$  la teneur volumique en eau ;  $F_{rev}$  la fraction réversible d'adsorption des cellules et  $F_{irr}$  la fraction irréversible de fixation des cellules.

La fraction réversible correspond à une cinétique d'adsorption du 1<sup>er</sup> ordre de type Langmuir :

$$\frac{\partial F_{rev}}{\partial t} = \alpha^* \left( S_{\max} \frac{KC_{aq}}{1 + KC_{aq}} - S \right) \quad \text{Eq. IV-2}$$

avec  $S_{max}$  (UFC L<sup>-1</sup>) : la capacité maximale d'adsorption des cellules bactériennes sur la matrice poreuse ;  $K$  (L<sup>3</sup> UFC<sup>-1</sup>) le coefficient d'adsorption des cellules sur la matrice poreuse et relié à l'énergie d'interaction avec les surfaces ;  $S$  (UFC.L<sup>-3</sup>) la concentration de cellules sorbées sur la matrice poreuse et  $\alpha^*$  un coefficient de dimension (L<sup>-3</sup> T<sup>-1</sup>) qui prend en considération la cinétique de réaction d'adsorption.

La fraction irréversible correspond à un terme de consommation d'ordre 0 :

$$\frac{\partial F_{irr}}{\partial t} = \mu \quad \text{Eq. IV-3}$$

avec  $\mu$  (UFC L<sup>-3</sup> T<sup>-1</sup>) : une constante représentant à la fois la disparition des cellules et/ou leur fixation irréversible sur la matrice poreuse ; il s'agit du nombre de cellules sorbées sur la matrice solide par volume d'eau et temps écoulés.

Pour cette étude, le logiciel STANMOD a été utilisé en résolution inverse afin de déterminer différents paramètres de nos expériences, dont notamment le facteur de retard, le coefficient de dispersion ainsi que le bilan de masse. A partir de nos données expérimentales, le logiciel trace la courbe qui correspond le mieux à nos données en se basant sur l'équation de convection-dispersion. On peut ainsi déterminer les valeurs des paramètres de transfert après ajustement de nos courbes expérimentales.

#### IV-2-5. Théorie de l'étude du transport de solutés en colonnes de laboratoire

De manière classique on définit les caractéristiques suivantes (Gaudet et Vauclin, 2005; Martins, 2008):

- Le volume total de la colonne  $V_T$ .

- La masse volumique du milieu  $\rho_d = \frac{m_s}{V_T}$  Eq. IV-4

où  $m_s$  est la masse de sable introduit dans la colonne.

La porosité de la matrice,  $n$ , correspond au volume relatif de vide dans le milieu poreux sec :

$$n = 1 - \frac{\rho_d}{\rho_s} \quad \text{Eq. IV-5}$$

où  $\rho_s$  est la masse volumique du solide constituant le milieu poreux (pour le sable d'Hostun  $\rho_s = 2.65 \text{ kg.m}^{-3}$ , donnée du fournisseur).

- Le volume de pore  $V_p$  est le volume de vide cumulé dans le milieu poreux sec. Il est calculé en pratique à partir de la porosité

$$V_p = nV_T \quad \text{Eq. IV-6}$$

- Le volume d'eau dans la colonne,  $V_{eau}$  est mesuré expérimentalement par pesée de la colonne avant et après saturation en eau. Lorsque la colonne est totalement saturée en eau, on a alors  $V_{eau} = V_p$

- La teneur en eau volumique,  $\theta$ , correspond au volume d'eau dans la colonne divisé par

$$\theta = \frac{V_{eau}}{V_T} \quad \text{Eq. IV-7}$$

le volume total de la colonne :

- Si la colonne est parfaitement saturée, la teneur en eau est égale à la porosité. En pratique ce n'est jamais le cas, on calcule alors un degré de saturation

$$S_R = \frac{\theta}{n} \quad \text{Eq. IV-8}$$

- La loi de Darcy décrit l'écoulement de l'eau dans un milieu poreux à l'échelle de l'élément de volume représentatif ou EVR. A cette échelle, on considère que le fluide s'écoule dans tout le milieu continu à une vitesse fictive appelée vitesse de Darcy,  $q$ . On la distingue de la vitesse de pore qui est la vitesse moyenne de l'eau dans l'espace poral (phase liquide du milieu poreux saturé).

La vitesse de Darcy représente une densité de flux volumique, qui fait intervenir le débit volumique d'eau,  $Q$ , et la surface totale de la section du milieu poreux considéré,  $S$ .

$$q = \frac{Q}{S} \text{ (m.s}^{-1}\text{)} \quad \text{Eq. IV-9}$$

Il s'agit d'une vitesse fictive, puisqu'elle suppose que toute la surface (y compris les grains solides) participe à l'écoulement. En fait l'eau ne s'écoule qu'à travers les pores du milieu (le volume dans lequel s'effectue l'écoulement est le volume poral occupé par l'eau,  $V_e$ ). Une définition de la vitesse d'écoulement moyenne dans les pores,  $v$ , est le rapport entre la vitesse de Darcy et la teneur en eau effective dans le processus d'écoulement.

$$v = \frac{q}{\theta_{eff}} \text{ (m.s}^{-1}\text{)} \quad \text{Eq. IV-10}$$

- Le temps de séjour  $T_s$  correspond au temps de parcours moyen d'une molécule de soluté ou d'une particule dans la colonne. Le temps de séjour pour un soluté non réactif est

$$T_s = \frac{L}{v} \quad \text{Eq. IV-11}$$

avec  $L$  la longueur de la colonne et  $v$  la vitesse de pore du soluté.

Dans cette étude, le signal d'entrée sera toujours un créneau (de suspension bactérienne, de solution métallique ou de traceur) de longueur  $\delta t$  et de concentration  $C_0$  ; la courbe de percée de l'élément considéré représente l'évolution de la concentration de cet élément en phase liquide en fonction du temps  $C(t)$ . Afin de comparer les courbes entre elles et d'identifier les mécanismes de transfert, les courbes de percée sont présentées sous forme adimensionnelle :

$$\frac{C}{C_0} = f \frac{V}{V_0} \quad \text{Eq. IV-12}$$

avec  $V$  le volume de solution écoulee et  $V_0$  le volume d'eau dans la colonne.

#### IV-2-5-1. Analyse des courbes de percée : méthode des moments

L'analyse de la courbe de percée permet d'identifier certains mécanismes impliqués dans le transport des bactéries ou des métaux dans le milieu poreux étudié. Des traçages préalables (traceur de l'écoulement de l'eau :  $\text{Br}^-$ ) permettent de définir les propriétés hydrodynamiques du milieu poreux, qui correspondent aux fonctions de transfert de l'eau.

La courbe de percée peut être analysée à partir des moments temporels d'ordre  $N$ . Le moment d'ordre 0 ( $M_0$ ) est proportionnel à la masse. Dans le cas d'un créneau d'entrée de concentration  $C_0$  et de durée  $\delta t$ , il est égal à

$$M_0 (\text{entrée}) = \int_0^{\infty} C \cdot dt = C_0 \cdot \delta t \quad \text{Eq. IV-13}$$

Il permet de calculer le bilan de masse,  $BM$ , relatif au soluté ou à la particule à partir de la courbe de percée

$$BM = M_0 (\text{sortie}) / M_0 (\text{entrée}) \quad \text{Eq. IV-14}$$

Si  $BM = 1$  alors il y a conservation du soluté introduit, cela correspond, par exemple, au signal d'un bon traceur de l'écoulement de l'eau ou au transfert d'un soluté n'engageant que des réactions entièrement réversibles. Si  $BM < 1$  alors on en déduit que le soluté subit des interactions irréversibles avec le solide ou des transformations (dégradation chimique ou biologique, volatilisation, consommation...).

Le temps de séjour d'un soluté peut être obtenu à partir du moment réduit d'ordre 1 :

$$TS = E(\text{sortie}) - E(\text{entrée}) \quad \text{Eq. IV-15}$$

$$\text{où } E = \frac{M_1}{M_0}$$

Le rapport des temps de séjour du soluté et de l'eau permet de calculer le facteur de retard du soluté :

$$R = TS (\text{soluté}) / TS (\text{eau}) \quad \text{Eq. IV-16}$$

Si  $R = 1$  alors le soluté se comporte comme un traceur de l'écoulement. Si  $R < 1$  alors le soluté s'écoule plus vite que les molécules d'eau ; cela peut indiquer par exemple un phénomène d'exclusion anionique, c'est-à-dire que le volume « visité » par le soluté est inférieur au volume de pore. Si  $R > 1$  alors le soluté (ou la particule) subit des interactions avec la matrice poreuse qui le ralentissent par rapport aux molécules d'eau. On parle alors de liaisons réversibles avec le milieu.

## IV-3. Résultats

### IV-3-1. Caractérisation du sable d'Hostun

#### IV-3-1-1. Taille et forme des grains

La granulométrie du sable d'Hostun a été mesurée en granulométrie laser (Master sizer 2000, Malvern Instruments) et les résultats sont présentés sur la Figure IV-3. Le diamètre médian du sable ( $d_{50}$ ) est égal à  $285 \mu\text{m}$  et le coefficient d'uniformité  $U$ , défini comme le rapport  $d_{60}/d_{10}$  est de 1,72. Ce coefficient étant inférieur à 2, on peut donc considérer le sable comme uniforme (Musy et Soutter, 1991).

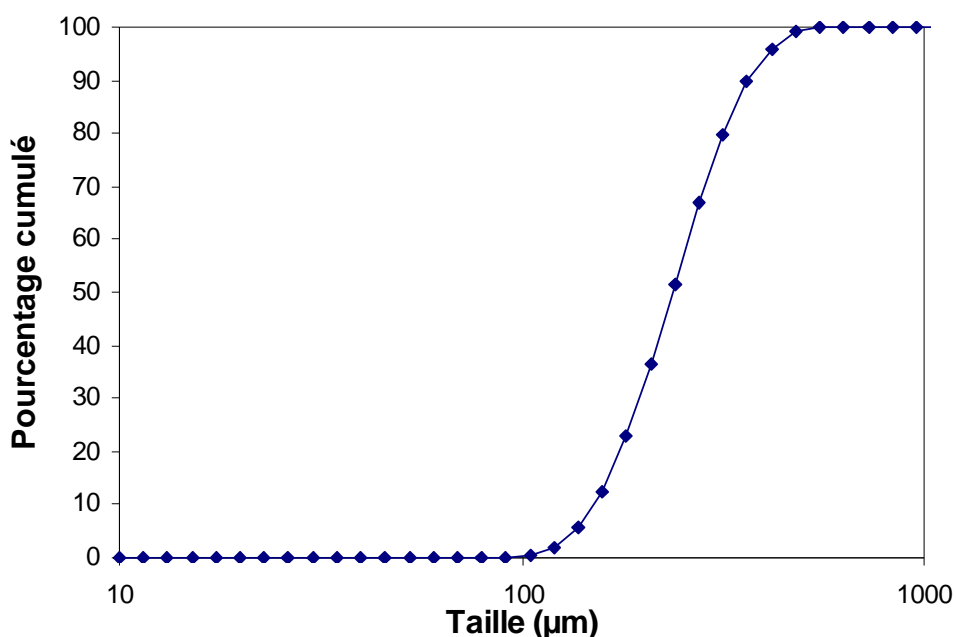


Figure IV-3: Granulométrie cumulée du sable d'Hostun HN34 après lavage à l'acide nitrique.

#### IV-3-1-2. Charge de surface du sable d'Hostun

La caractérisation de la charge de surface des grains de sable a été réalisée par la mesure du potentiel zêta. Pour cela, 7 g de sable et 30 mL d'eau déionisée ont été mélangés dans un flacon puis vigoureusement agités pendant 3 heures. La suspension est ensuite laissée à décanter pendant 6 jours et le potentiel zêta des colloïdes en suspension dans le surnageant est mesuré avec un zetamètre (NanoZS, Malvern Instruments). Le potentiel zêta est mesuré à différents pH en commençant par la valeur à l'équilibre (8.5) et en allant vers les pH acides en ajoutant de petits volumes de HCl à 0.1M par un titreur automatique (Autotitrator mpt-2, Malvern Instruments). Avec cette méthode, seul le potentiel zêta des particules fines du sable est mesuré. On note que pour le pH d'étude, le potentiel zêta est d'environ -20 mV.



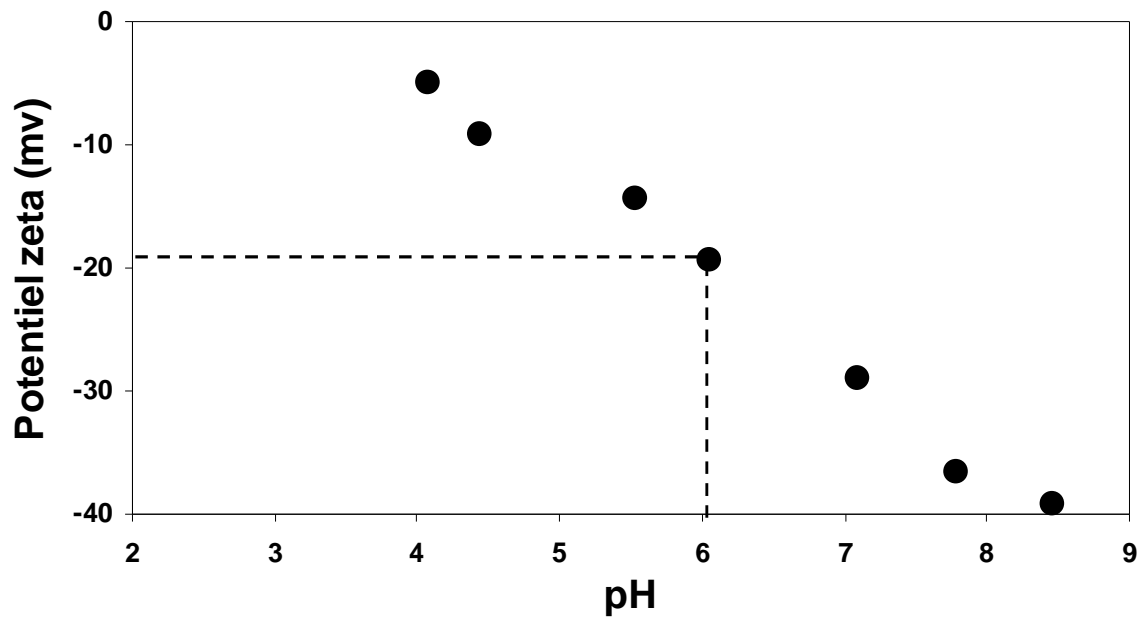


Figure IV-4: Evolution du potentiel zêta des particules fines du sable d'Hostun avec le pH mesuré avec un zetamètre (NanoZS, Malvern Instruments).

### IV-3-2. Caractérisation des propriétés bio-physicochimiques des bactéries modèles

#### IV-3-2-1. Morphologie des cellules bactériennes

De nombreux tests ont été effectués par Guiné (2006) sur les deux souches bactériennes afin de caractériser leurs morphologies et leurs propriétés de surface. Les deux souches sont des bactéries à Gram négatif, en forme de bâtonnet. *E. coli* K12DH5 $\alpha$  est plus grande que *C. metallidurans* CH34 et possède donc une surface spécifique plus faible. Les caractéristiques morphologiques des deux espèces sont présentées dans le Tableau II-3.

#### IV-3-2-2. Analyse granulométrique des deux bactéries modèles

La granulométrie des deux bactéries a été mesurée en granulométrie laser (Master sizer 2000, Malvern Instruments), après rinçage des cellules et suspension dans de l'eau distillée. Les résultats présentés sur la Figure IV-5 confirment la plus grande taille de *E. coli* K12DH5 $\alpha$  ( $d_{50} = 1.4 \mu\text{m}$ ) par rapport à *C. metallidurans* CH34 ( $d_{50} = 1.2 \mu\text{m}$ ). On remarque que le diamètre hydrodynamique moyen des cellules est toutefois relativement proche.

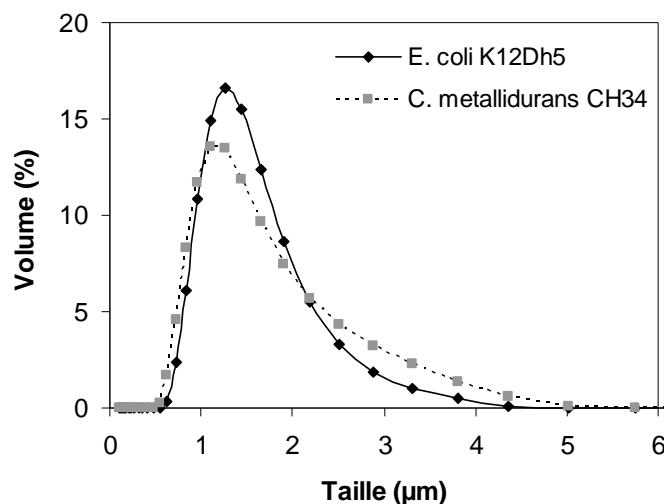


Figure IV-5 : Distribution de taille des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 et de *Escherichia coli* K12DH5α dans de l'eau distillée en granulométrie laser (Mastersizer 2000, Malvern).

#### IV-3-2-3. Hydrophobie et potentiel zêta = f(pH)

Différents tests ont été menés par Guiné (2006), afin de déterminer l'hydrophobie des deux souches (test MATH, test d'adhésion au polystyrène et test SAT). Les tests utilisés ont permis de montrer que les cellules de *C. metallidurans* CH34 et de *E. coli* K12DH5α sont plutôt hydrophiles et présentent peu de différences pour cette propriété.

Les potentiels de charge de surface de particules ne sont pas mesurables directement. Ils sont soit modélisés soit approximatés par la mesure du potentiel Zêta (en mV) qui renseigne sur l'importance de la répulsion ou de l'attraction entre les particules. A pH 6 et dans l'eau déminéralisée, *C. metallidurans* CH34 possède un potentiel Zêta d'environ -10 mV alors que pour *E. coli* K12DH5α il est d'environ -50 mV (Figure IV-6).

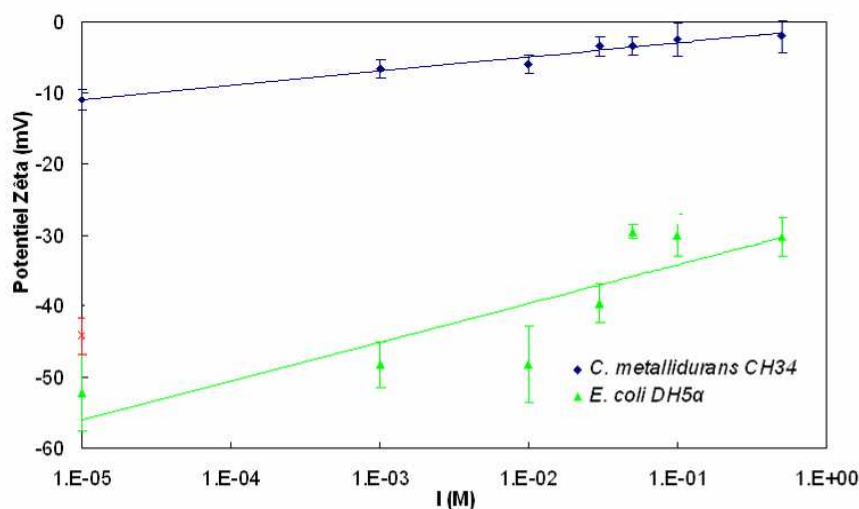


Figure IV-6: Potentiel zêta de *Cupriavidus metallidurans* CH34 (en bleu) et *Escherichia coli* K12DH5α (en vert) à pH 6 et à différentes forces ioniques (d'après Guiné, 2006).

#### IV-3-2-4. Calcul des profils énergétiques d'interaction entre le sable d'Hostun et les bactéries modèles

A partir des valeurs de potentiels zêta mesurés pour le sable d'Hostun et les cellules bactériennes, les profils d'énergie d'interaction entre les deux bactéries modèles et le sable d'Hostun ont été calculés par le modèle DLVO avec de l'eau distillée (Figure IV-7).

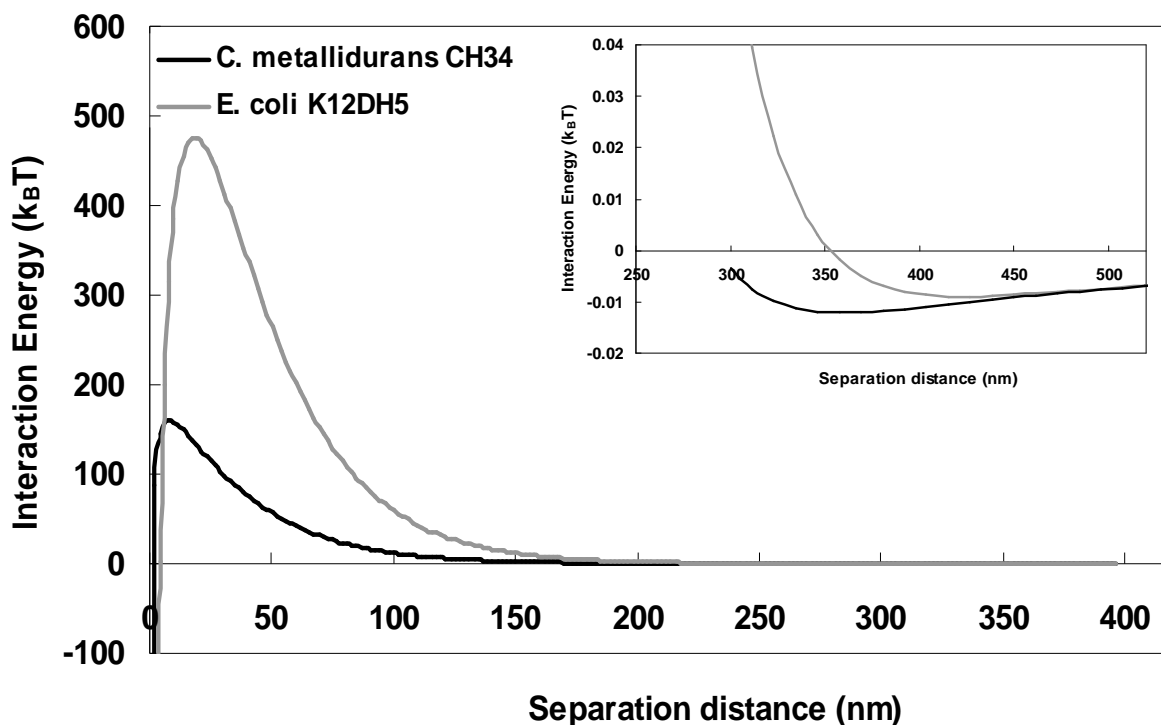


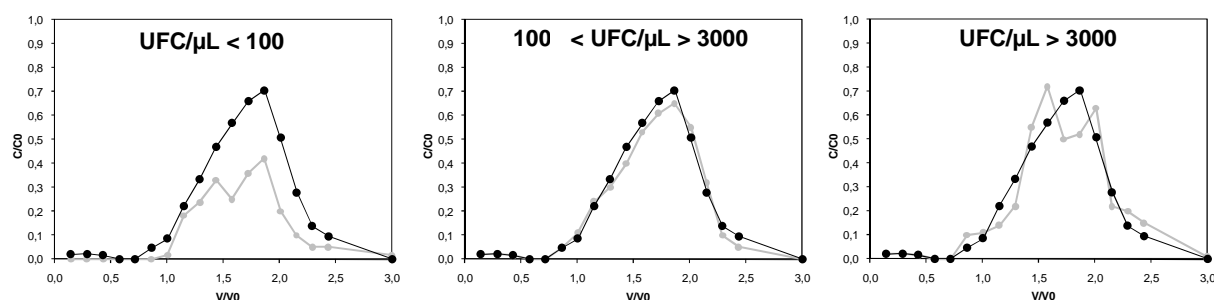
Figure IV-7 : Profils d'énergie d'interaction entre les deux bactéries modèles et le sable d'Hostun calculés par le modèle DLVO avec de l'eau distillée (Constante de Hamacker  $6.5 \cdot 10^{-21}$  J).

Pour les deux bactéries on remarque une barrière d'énergie d'interaction dont la hauteur est plus importante pour *E. coli* K12DH5 $\alpha$  en accord avec sa plus forte électronégativité. On remarque qu'il existe un minimum secondaire d'énergie plus important pour *C. metallidurans* CH34 (vers 350 nm) par rapport à *E. coli* K12DH5 $\alpha$ .

#### IV-3-3. Application de la cytométrie en flux au dénombrement des cellules bactériennes

Un des objectifs de ce travail étant d'étudier le transfert de cellules bactériennes en mélange et à faible concentration, nous avons besoin d'une méthodologie permettant de quantifier simultanément deux types de bactéries. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser la cytométrie en flux qui présente de nombreux avantages (forte sensibilité, utilisation de la fluorescence, automatisation, coût faible...). L'application de la cytométrie en flux au dénombrement des cellules bactériennes en sortie de colonne a nécessité une longue mise au point concernant la préparation des échantillons ainsi que le paramétrage de l'appareil. En effet c'est une technique qui est préférentiellement adaptée aux grosses cellules et cela pose donc des problèmes quand on s'intéresse à des petites cellules. Avant d'analyser les échantillons, il est nécessaire d'optimiser les réglages de l'appareil en adéquation avec le type

de cellules et le type de marquage. Différents paramètres, tel que la dilution des échantillons et le choix des seuils de détection, se sont avérés importants pour optimiser la qualité du dénombrement des cellules bactériennes en sortie de colonne. Concernant le choix de la dilution et de la préparation des échantillons, de nombreux tests ont été réalisés afin d'étudier l'effet de la concentration cellulaire des échantillons analysés sur les résultats donnés par le cytomètre. Au final une dilution permettant d'avoir entre 100 et 3000 cellules/ $\mu\text{L}$  s'est avérée optimale comme le montre la Figure IV-8. En effet, si la concentration cellulaire est trop faible ou trop forte les cytogrammes sont difficilement exploitables (effet du bruit de fond ou saturation du signal). Enfin «l'effet concentration» implique que tous les échantillons d'un même essai, y compris la suspension cellulaire d'injection initiale, soient dilués par le même facteur, faute de quoi les résultats sont ensuite difficiles à exploiter ou entachés d'erreurs importantes comme montre la Figure IV-8.



**Figure IV-8: Comparaison des courbes de percée de *C. metallidurans* CH34 obtenues en spectrophotométrie ( $\text{DO}_{600}$ ) et cytométrie de flux à différentes concentrations cellulaires.**

Le cytomètre C6 utilisé dans cette étude présente une limite de détection extrêmement basse et impose donc de travailler avec des seuils analytiques spécifiques. Un premier permet de sélectionner les événements (particules ou cellules) d'une taille supérieure à ce seuil et donc d'éliminer le bruit de fond correspondant aux débris et au bruit électronique (Maynadié, 2006). Le second seuil est basé soit sur la forme ou la transparence des objets (SSC) mesurés, soit sur leur fluorescence (FL). Comme nous avons la possibilité de travailler avec des cellules marquées par fluorescence, le second seuil choisi est un seuil de fluorescence. Le choix et le bon paramétrage de ces seuils permettent d'optimiser les résultats, qui sont ainsi «fenêtrés», le cytomètre ne quantifie alors que les cellules et n'est pas perturbé par des événements étrangers, notamment le bruit de fond qui est important si on ne prend pas en compte ces seuils. Nous avons dû optimiser ces seuils pour chaque souche bactérienne selon les conditions suivantes :

- Pour *E. coli* K12Dh5 $\alpha$  YFP un seuil de 3000 sur FSC-H (taille) et un seuil de 1500 sur FL1-H (laser bleu) s'avèrent optimaux et permettent de supprimer au maximum le bruit de fond sans perdre d'informations sur les bactéries étudiées. L'utilisation des seuils déterminés précédemment permet une bonne discrimination des cellules de *E. coli* K12Dh5 $\alpha$  lors des analyses en CMF (Figure IV-9). On remarque que le pic de fluorescence est bien déterminé et que la population bactérienne se distingue bien du bruit de fond.

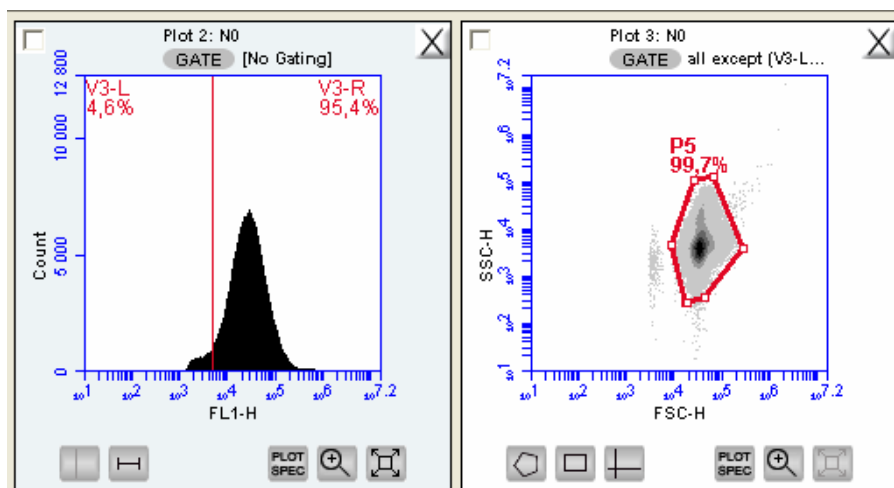


Figure IV-9: Exemple d'histogramme de fluorescence (FL1-H) et de cytogramme (SSC-H versus FSC-h) obtenu sur le cytomètre C6 d'Accuri pour la quantification de *Escherichia coli* K12Dh5a YFP après optimisation analytiques.

– Pour *C. metallidurans* CH34 marquée avec le fluorochrome SYTO9, un seuil de 3000 sur FSC-H (taille) et un seuil de 1500 sur FL1-H (laser bleu).

– Pour *C. metallidurans* CH34 marquée avec le fluorochrome SYTOred 62 un seuil de 3000 sur FSC-H (taille) et un seuil de 3000 sur FL4-H (laser rouge).

Ces deux fluorochromes ont été utilisés séparément selon les conditions expérimentales : le Syto9 pour les essais de transfert de *C. metallidurans* CH34 seule et le Sytored62 pour les essais de transfert de mélange des cellules de *C. metallidurans* CH34 et de *E. coli* K12Dh5a.

#### IV-3-3-1. Quantification des cellules bactériennes en conditions de mélange

Afin de tester la possibilité d'analyser un mélange de cellules bactériennes en cytométrie, des tests ont d'abord été effectués à partir de bactéries cultivées séparément puis mélangées juste avant analyse. Dans ce cas, les cellules de *E. coli* K12Dh5a sont préalablement rincées trois fois à l'eau distillée. Les cellules de *C. metallidurans* CH34 sont rincées trois fois à l'eau distillée puis mise en contact avec le Sytored 62 pendant 15 minutes à l'obscurité avant d'être mélangées avec les cellules de *E. coli* K12Dh5a à concentration équivalente. Les mélanges de bactéries sont alors analysés en cytométrie. Pour cela une première série d'analyses est réalisée avec un seuil sur le laser bleu (FL1-H >1500) afin de quantifier spécifiquement la population de *E. coli* K12Dh5a. Une seconde série d'analyses est ensuite réalisée sur les mêmes échantillons mais avec un seuil sur le laser rouge (FL4-H > 2000) afin de quantifier spécifiquement les cellules de *C. metallidurans* CH34 marquées au Sytored 62. Les cytogrammes et histogrammes obtenus en cytométrie sont présentés dans la Figure IV-10.

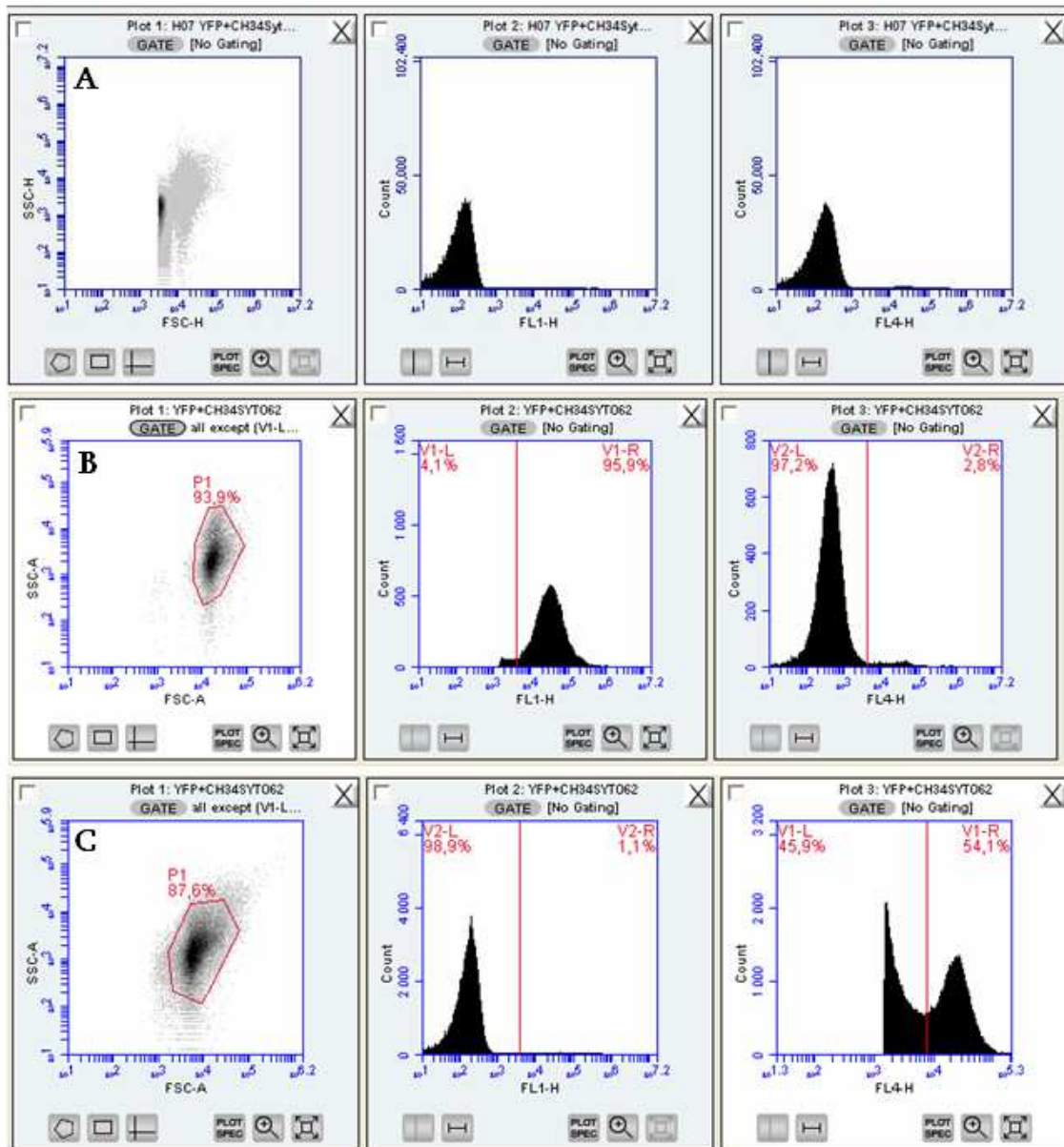


Figure IV-10: Exemples de cytogrammes et d'histogrammes de fluorescence obtenus lors de la quantification du mélange de cellules de *Escherichia coli* K12Dh5a YFP et *Cupriavidus metallidurans* CH34. En A, cytogramme et histogrammes bruts obtenus sans seuil analytique. En B, cytogramme et histogrammes bruts obtenus avec un seuil placé sur le laser bleu (FL1). En C, cytogramme et histogrammes bruts obtenus avec un seuil placé sur le laser rouge (FL4).

La Figure IV-10 A montre un exemple de cytogramme brut du mélange obtenu sans seuil analytique au niveau de la fluorescence et un seuil uniquement sur la taille FSC-H. De cette manière les deux populations bactériennes ne sont pas différenciables et on note que le bruit de fond est important. Dans la Figure IV-10 B, un seuil a été placé sur le laser bleu (FL1-H >1500) afin de ne détecter que la souche *E. coli* K12Dh5a. On observe ainsi aucune fluorescence (à droite du seuil vertical) sur le laser rouge (FL4) et que les cellules de *C. metallidurans* CH34 marquées au Sytored 62 ne sont pas prises en compte dans la quantification. On peut donc dénombrer spécifiquement les cellules de *E. coli* K12Dh5a. De la même manière, dans la Figure IV-10 C, un seuil a été placé sur le laser rouge (FL4-H > 2000) afin de détecter spécifiquement les cellules de *C. metallidurans* CH34 colorées au Sytored 62. On voit que dans ce cas on n'a aucune fluorescence sur le laser bleu (FL1) et que

les cellules de *E. coli* K12Dh5 $\alpha$  ne sont pas prises en compte dans la quantification. Ces résultats montrent que l'utilisation du Sytored62, de par ses longueurs d'ondes d'émission et d'excitation, nous permet bien de quantifier spécifiquement chaque population bactérienne en mélange grâce à leur fluorescence respective.

#### IV-3-4. Etude du transport des 2 bactéries modèles en colonne de sable d'Hostun : mise au point méthodologique

Des tests de transport des bactéries modèles en colonne de sable d'Hostun ont été réalisés avec une concentration initiale d'injection correspondant à une  $DO_{600}$  de 1, soit une concentration cellulaire de  $1.10^9$  et  $4.10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> pour *E. coli* K12DH $\alpha$  et *C. metallidurans* CH34, respectivement. Ces concentrations ont été choisies pour des raisons de facilité de quantification en routine en spectrophotométrie.

##### IV-3-4-1. Reproductibilité des essais de transfert des bactéries

Les courbes de percée de *E. coli* K12Dh5 $\alpha$  et de *C. metallidurans* CH34, pour une concentration d'injection de  $10^9$  et de  $4 \cdot 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> ( $DO_{600}=1$ ), respectivement, sont présentées sur la Figure IV-11.

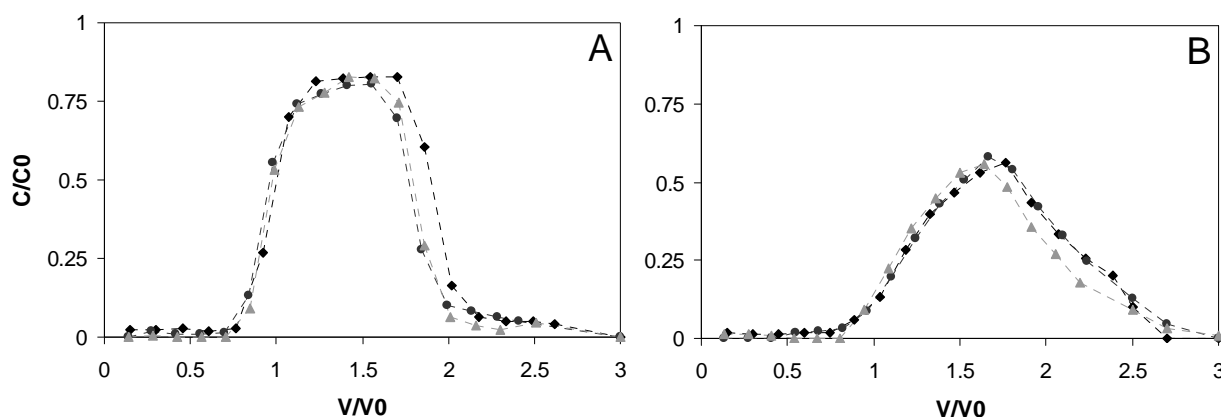


Figure IV-11: Courbes d'élution tripliquées des cellules de *Escherichia coli* K12DH5 $\alpha$  (A) et de *Cupriavidus metallidurans* CH34 (B) en colonne de sable d'Hostun.

On remarque que pour les deux bactéries les courbes tripliquées sont très proches, notamment sur le front montant indiquant une bonne reproductibilité des essais. Les différences concernant le front descendant des courbes de percée sont simplement dues à des différences de volume de cellules injectées. Les bilans de masse des cellules en sortie de colonne sont de  $85\% \pm 2.6$  pour *E. coli* K12Dh5 $\alpha$  et de  $60\% \pm 3.9$  pour *C. metallidurans* CH34 confirmant la bonne reproductibilité des essais.

#### IV-3-4-2. Application de la cytométrie en flux pour la quantification des bactéries dans les effluents de colonnes de sable

##### *Escherichia coli* K12DH5a

Après avoir déterminé les conditions optimales d'utilisation du cytomètre pour la quantification des cellules dans les effluents de colonne, nous avons appliqué cette méthodologie à des essais de transfert (Figure IV-12). Cette figure présente les courbes de percée de *E. coli* K12Dh5a quantifiés par spectrophotométrie et cytométrie en flux.

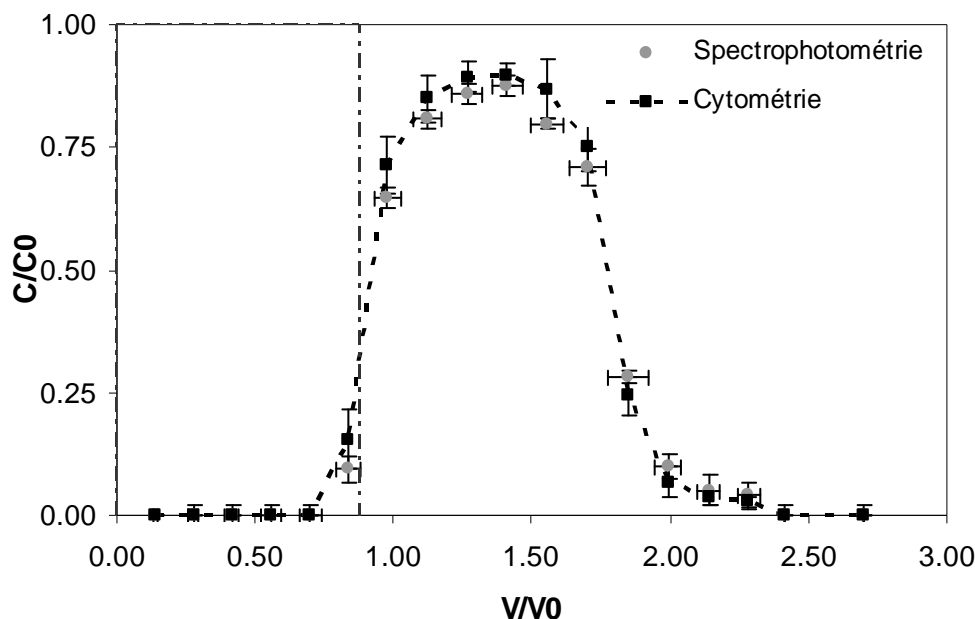


Figure IV-12 : Courbes d'élution de *Escherichia coli* K12DH5a en colonne de sable d'Hostun à une concentration cellulaire de  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> mesurées en spectrophotométrie et en cytométrie de flux. (Les écart-types sont calculés à partir des triplicats).

On remarque que les courbes de percée obtenues par spectrophotométrie et par cytométrie sont très proches, notamment concernant le début et la fin de l'élution, les différences observées concernant essentiellement le plateau de la courbe qui est légèrement supérieur en cytométrie. En effet, les bilans de masse des cellules en sortie de colonne calculés sont de  $85\% \pm 2.6$  pour les analyses en spectrophotométrie et de  $92\% \pm 2.1$  pour les analyses en cytométrie. Ces résultats confirment la possibilité d'appliquer la cytométrie en flux pour la quantification de cellules bactériennes intrinsèquement fluorescentes dans les effluents de colonne.

##### *Cupriavidus metallidurans* CH34

Contrairement à la bactérie *E. coli* K12Dh5a, *C. metallidurans* CH34 n'est pas fluorescente, il est donc nécessaire de colorer les cellules bactériennes pour pouvoir les dénombrer précisément en CMF. Pour cela nous avons utilisé les fluorochromes Syto9 (vert) et SytoRed 62 (rouge) spécifiques des acides nucléiques. Comme pour *E. coli* K12Dh5a, il a fallu valider la méthodologie, pour cela nous avons adopté deux approches distinctes : coloration des cellules avant les essais de transfert en colonnes ou après les essais de transfert. Les courbes d'élution de *C. metallidurans* CH34 obtenues avec coloration avant et après les



essais de transfert sont présentées dans la Figure IV-14 en comparaison avec les courbes obtenues par spectrophotométrie.

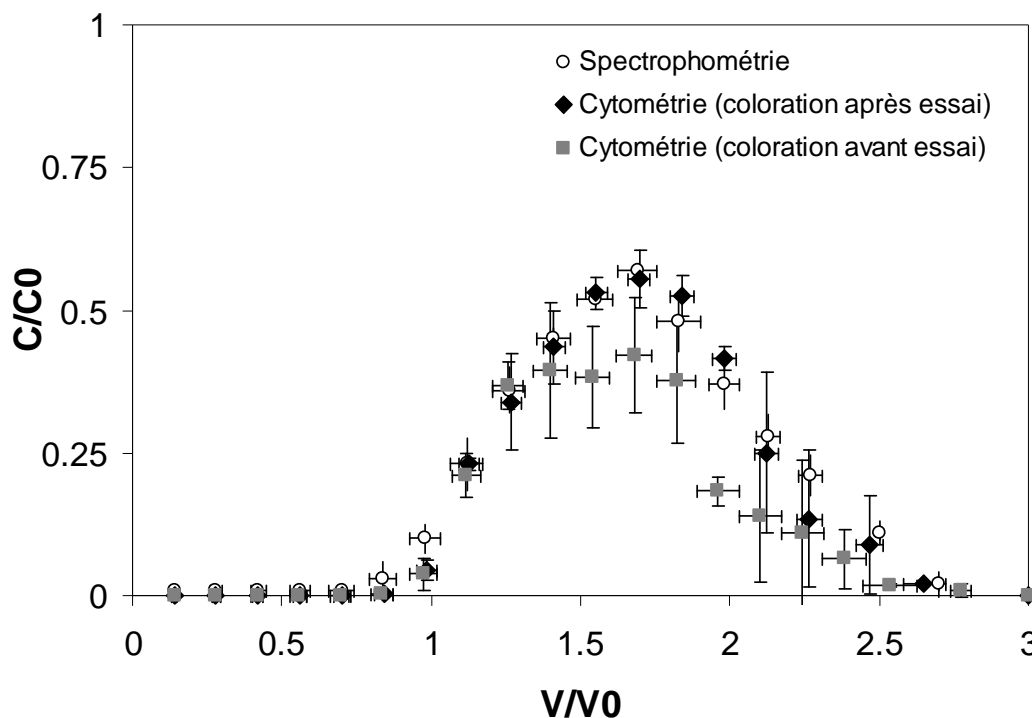


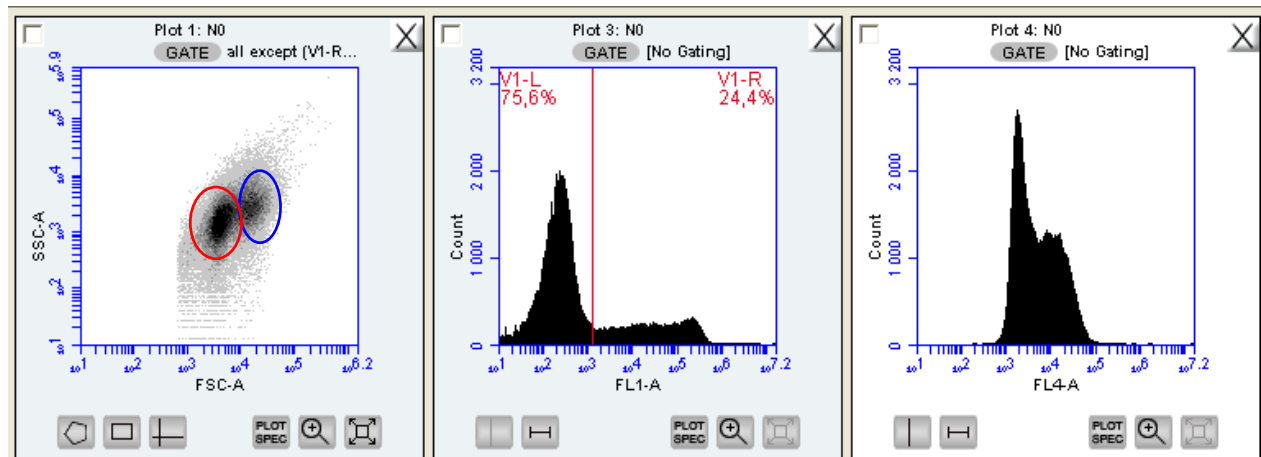
Figure IV-13 : Courbes d'élution de *Cupriavidus metallidurans* CH34 en colonne de sable d'Hostun à une concentration cellulaire de  $4.10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> mesurées en spectrophotométrie et en cytométrie en flux. (Les écart-types sont calculés à partir des triplicats).

Les résultats montrent une forte variabilité et une reproductibilité moins satisfaisante par rapport aux essais réalisés avec *E. coli* K12Dh5α. On remarque que colorer les cellules après leur passage en colonne permet une meilleure quantification des cellules. En effet les essais réalisés avec les cellules marquées avant les expériences de transfert présentent une très forte variabilité et une précision moindre. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces variabilités :

- Maynadié (2006) préconise un temps de contact court entre les cellules et les fluorochromes avant l'analyse en CMF afin de ne pas perdre de fluorescence ce qui pourrait expliquer les plus fortes différences observées lors des expériences réalisées en colorant les cellules bactériennes avant les essais de transfert qui durent plusieurs heures. Pour améliorer l'analyse, une solution pourrait être d'augmenter la concentration de fluorochrome mais alors le coût d'analyse deviendrait plus important.

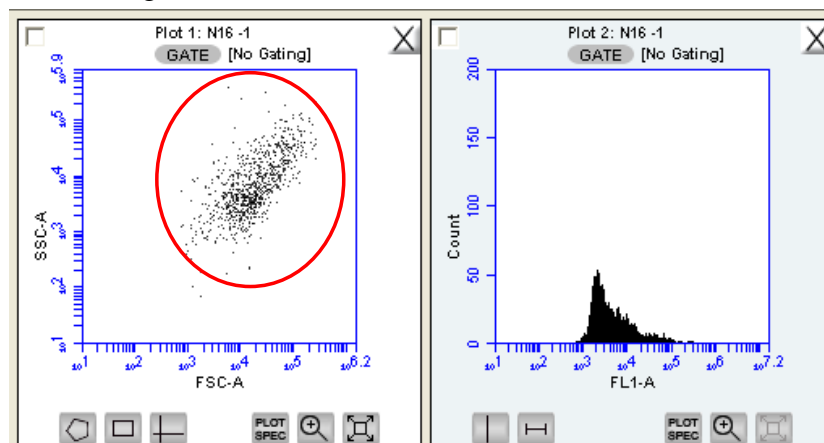
- Il se peut également que le fluorochrome modifie les propriétés des cellules induisant une modification de leur comportement dans le milieu.

- L'ajout de colorant dans les échantillons conduit également au marquage de cellules bactériennes ou d'autres particules présentes naturellement dans le milieu, compliquant ainsi l'analyse car les cytogrammes peuvent alors présenter plusieurs populations comme le montre la Figure IV-14.



**Figure IV-14 :** Exemple d'histogrammes de fluorescence (FL1-A et FL4-A) et de cytogramme (SSC-A versus FSC-A) obtenus en cytométrie de flux pour la quantification de cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 colorées au Sytored62 avant les essais de transfert en colonne.

- Enfin, pour les faibles concentrations bactériennes, la fluorescence est faible et rend l'analyse difficile car le signal de fluorescence est proche du bruit de fond. Les cytogrammes sont alors diffus et il devient difficile de quantifier précisément la population bactérienne, comme illustré dans la Figure IV-15.



**Figure IV-15 :** Exemple d'histogramme de fluorescence (FL1-A) et de cytogramme (SSC-A versus FSC-A) obtenu en cytométrie de flux pour la quantification de faibles concentrations de cellules *Cupriavidus metallidurans* CH34 colorées au Syto9 après les essais de transfert en colonne.

L'application de la CMF sur des cellules colorées par des fluorochromes permet donc de quantifier assez précisément les cellules bactériennes en sortie de colonne, à conditions de répéter les expériences. De plus l'utilisation de fluorochromes après les essais de transfert s'avère préférable. Toutefois, cette méthodologie ne permet pas de travailler de manière satisfaisante avec des concentrations cellulaires trop faibles par rapport à l'utilisation de bactéries intrinsèquement fluorescente.

#### IV-3-4-3. Effet du type de souche bactérienne sur le transfert des cellules bactériennes en colonnes de sable d'Hostun

L'effet souche bactérienne sur le transport de cellules bactériennes en colonne dans le sable d'Hostun a été étudié pour les deux bactéries modèles. Bien que les essais aient été

menés dans les mêmes conditions hydrodynamiques les deux souches bactériennes présentent une mobilité contrastée comme le montre la Figure IV-16 et le Tableau IV-2.

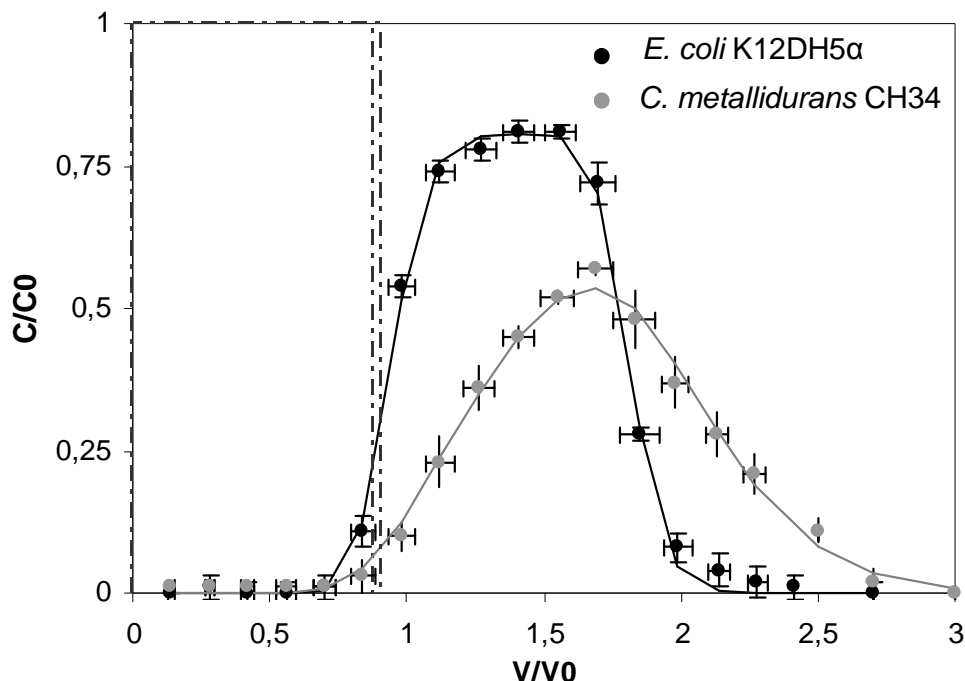


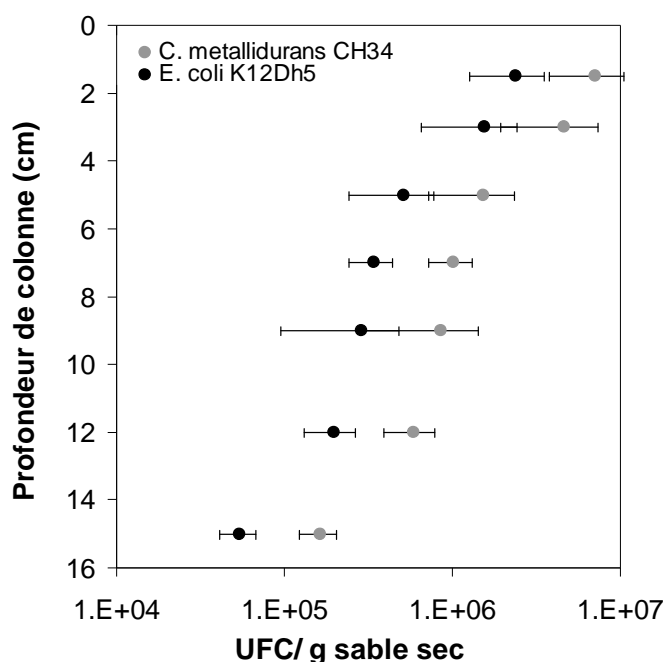
Figure IV-16: Courbes d'élution de *Escherichia coli* K12Dh5α ( $10^9$  UFC/mL) et *Cupriavidus metallidurans* CH34 ( $4 \cdot 10^8$  UFC/mL) en colonnes de sable d'Hostun. Les symboles correspondent à la moyenne calculée sur les triplicats, les lignes correspondent aux données modélisées par Stanmod. Les écarts types correspondent aux incertitudes sur les pesées pour l'axe des abscisses et à l'écart type moyen des expériences pour l'axe des ordonnées

La Figure IV-16 montre que les cellules de *E. coli* K12Dh5α semblent être transportées à la même vitesse que la solution et présentent peu d'interactions avec le milieu. En effet les bilans de masses mesurées à partir des analyses en spectrophotométrie sont de  $85 \pm 2.6$  % et le facteur de retard, estimé par modélisation, est de 0.95. Ceci est confirmé par la forme de la courbe de percée de *E. coli* K12Dh5α qui est relativement symétrique indiquant un comportement proche de celui d'un traceur de l'eau. Le bilan de masse calculé inférieur à 100% indique qu'il existe tout de même des interactions irréversibles entre la matrice et les cellules. Les cellules de *C. metallidurans* CH34 interagissent de manière plus importante avec la matrice et présentent des bilans de masse de  $60 \pm 3.9$  % indiquant une rétention importante des cellules bactériennes initialement injectées, caractéristiques d'interactions irréversibles avec la matrice sableuse. De plus, la forme de la courbe et le facteur de retard supérieur à 1 (1.35), estimé par modélisation, montrent qu'une part des interactions avec le milieu est également réversible (Guiné, 2006). On note également une plus forte dispersion des cellules de *C. metallidurans* CH34 confirmée par la modélisation.

**Tableau IV-2: Résultats expérimentaux et de simulation des expériences de transport de *E. coli* K12DH5a à différentes concentrations cellulaires analysées en cytométrie de flux (C6 Accuri).**

Bactérie	$C_0$ (UFC.mL <sup>-1</sup> )	$V_{\text{pore}}$ (ml)	Facteur retard R	Bilan de masse Bactérie (%)	D (cm <sup>2</sup> h <sup>-1</sup> )
<i>Escherichia coli</i> K12DH5a	$10^9$	34.3	0.95	85.2 ± 2.6	0.47
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	$4 \cdot 10^8$	33.6	1.35	60.4 ± 3.9	1.5

La forme des profils de rétention pouvant donner des informations importantes sur les mécanismes de dépôts dans la colonne (Bradford et al., 2002), la distribution verticale des bactéries retenues dans le sable d'Hostun a donc été étudiée afin d'estimer la répartition des cellules immobilisées dans le milieu en fin d'essai de transfert (Figure IV-17). Il est important de noter que la technique d'extraction des cellules retenues dans les colonnes ne permet pas d'extraire la totalité des cellules bactériennes retenues. Ces données renseignent donc sur la forme des profils mais ne permettent pas de compléter les bilans de masse. Les résultats présentés ont donc été corrigés en considérant que l'extraction des bactéries est proportionnelle dans tous les échantillons afin de compléter les bilans de masse. Les profils de rétention pour *C. metallidurans* CH34 et *E. coli* K12Dh5a, sont de type hyper-exponentiel, avec un taux de dépôt qui diminue avec la distance parcourue dans la colonne. On note que les deux profils de rétention normalisés sont très proches pour les deux bactéries.



**Figure IV-17 : Profils de rétention des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 et de *Escherichia coli* K12Dh5a dans la colonne en fin d'expérience de transfert en colonne de sable d'Hostun (V/V0 =4). Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type calculé sur les duplicats.**

### IV-3-5. Effet de la concentration cellulaire sur le transport des bactéries en colonne de sable d'Hostun

#### IV-3-5-1. *Escherichia coli* K12DH5 $\alpha$ .

La forte sensibilité d'analyse du cytomètre C6 d'Accuri nous a permis d'étudier le transfert de bactéries à des concentrations plus faibles que celles permises par les méthodes classiques, et ce de manière automatisée. Pour *E. coli* K12Dh5 $\alpha$ , nous avons pu travailler avec une gamme de concentrations allant de  $10^7$  à  $4.5 \cdot 10^9$  UFC/mL, c'est-à-dire dix fois plus faible que la concentration utilisable en spectrophotométrie UV-VIS. Les résultats de transfert de cellules de *E. coli* K12Dh5 $\alpha$  à différentes concentrations sont présentés dans la Figure IV-18.

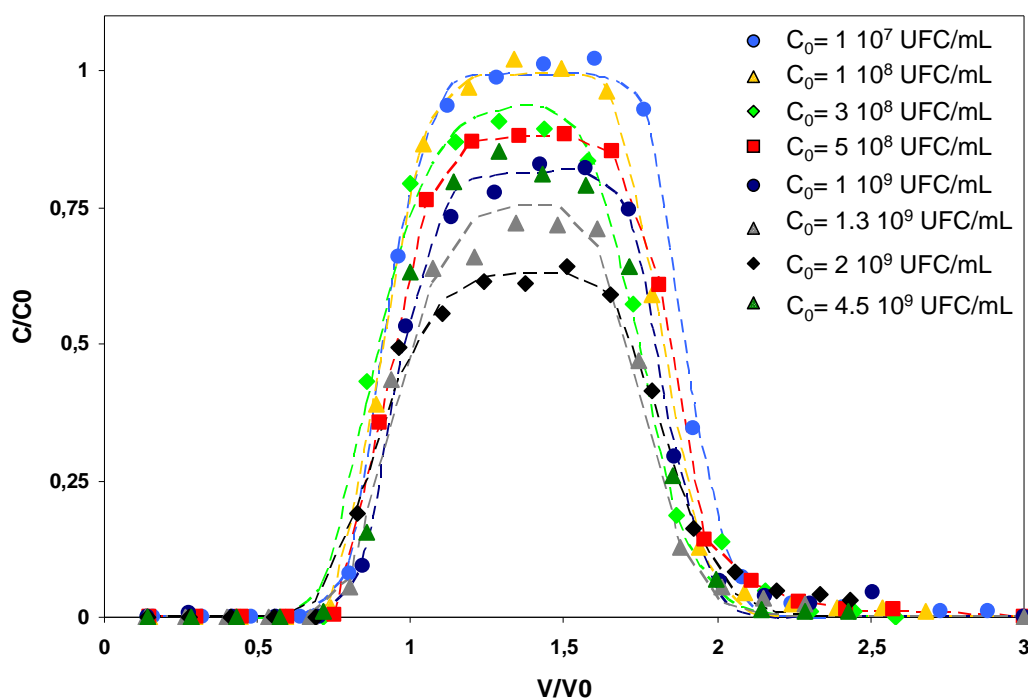


Figure IV-18: Courbes d'élutions de *Escherichia coli* K12DH5 $\alpha$  à différentes concentrations cellulaires initiales injectées: de  $10^7$  à  $4.5 \cdot 10^9$  UFC/mL. Les symboles correspondent aux données expérimentales et les pointillés aux données modélisées avec le logiciel Stanmod.

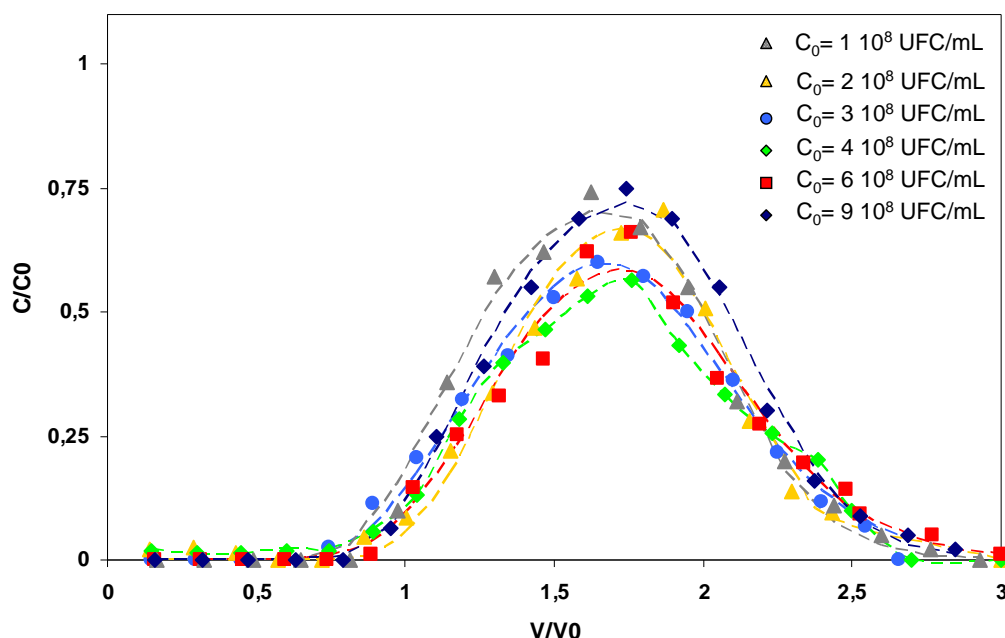
On note un effet de concentration important sur le transfert des cellules de *E. coli* K12Dh5 $\alpha$ . Aux plus faibles concentrations les bilans de masse sont de 100%, indiquant une très forte mobilité des cellules de *E. coli* K12Dh5 $\alpha$ . Lorsque la concentration de cellules injectées augmente, les bilans de masse diminuent, dans un premier temps, jusqu'à 65% à  $2 \cdot 10^9$  UFC/mL, indiquant une rétention importante des cellules, avant de remonter pour la plus forte concentration ( $4.5 \cdot 10^9$  UFC/mL) (Tableau IV-3).

**Tableau IV-3: Effet de la concentration cellulaire d'injection sur les paramètres de transfert de *Escherichia coli* K12DH5α en colonne de sable d'Hostun.**

Concentration injectée (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Volume injecté (ml)	Facteur retard R	Bilan de masse Bactérie (%)	D (cm <sup>2</sup> h <sup>-1</sup> )
10 <sup>7</sup>	33.9	0.92	100	0.44
10 <sup>8</sup>	30.9	0.92	100	0.49
3 10 <sup>8</sup>	30.1	0.90	91	0.58
5 10 <sup>8</sup>	30.8	0.94	87	0.46
10 <sup>9</sup>	32.1	0.97	88	0.41
1.3 10 <sup>9</sup>	27.8	0.97	78	0.63
2 10 <sup>9</sup>	33.4	0.91	65	0.65
4.5 10 <sup>9</sup>	29.6	0.95	81	0.64

#### IV-3-5-2. *Cupriavidus metallidurans* CH34

Nous avons vu précédemment que l'application de la cytométrie de flux à l'énumération de faibles concentrations de cellules de *C. metallidurans* CH34 grâce à des fluorochromes ne donnait pas des résultats satisfaisants en termes de précision. Pour cette bactérie nous avons donc énuméré les cellules par spectrophotométrie ce qui nous contraint à utiliser une gamme de concentrations plus étroite que pour *E. coli* K12Dh5α, allant de 10<sup>8</sup> à 9 10<sup>8</sup> UFC/mL. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure IV-19 et le Tableau IV-4.



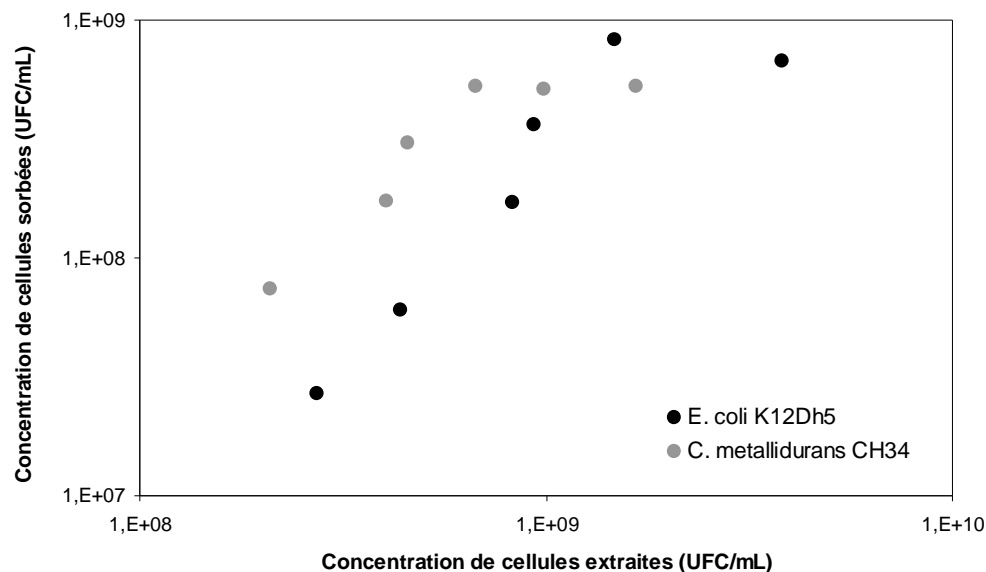
**Figure IV-19: Courbes d'élutions de *Cupriavidus metallidurans* CH34 à différentes concentrations cellulaires initiales injectées: de 10<sup>8</sup> à 9.10<sup>8</sup> UFC/mL. Les symboles correspondent aux données expérimentales et les pointillés aux données modélisées avec le logiciel Stanmod.**

La Figure IV-19 présentée en concentration adimensionnelle montre que dans nos conditions le transport de *C. metallidurans* CH34 n'est pas fortement sensible à la concentration d'injection contrairement à *E. coli* K12Dh5a. Il faut toutefois relativiser ces résultats au vu de l'étroitesse de la gamme de concentration. On remarque tout de même que le bilan de masse semble dans un premier temps diminuer avec l'augmentation de la concentration d'injection, comme observé pour *E. coli* K12Dh5a, puis augmente pour les plus fortes concentrations cellulaires d'injection (Tableau IV-4).

**Tableau IV-4: Effet de la concentration cellulaire d'injection sur les paramètres de transfert de *Cupriavidus metallidurans* CH34 en colonne de sable d'Hostun.**

Concentration injectée (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Volume injecté (ml)	Facteur retard R	Bilan de masse Bactérie (%)	D (cm <sup>2</sup> h <sup>-1</sup> )
9 10 <sup>8</sup>	31.1	1.27	74	1.4
6 10 <sup>8</sup>	28.4	1.36	63	1.3
4 10 <sup>8</sup>	30.6	1.32	59	1.6
3 10 <sup>8</sup>	28.3	1.35	73	1.3
2 10 <sup>8</sup>	29.2	1.31	76	1.5
1 10 <sup>8</sup>	31.4	1.19	77	1.5

A partir des courbes d'élution aux différentes concentrations cellulaires d'injection, des isothermes de sorption ont pu être déterminées pour les deux bactéries, en suivant la méthode proposée par (Schweich et Sardin, 1981) et en faisant l'hypothèse que les réactions de sorption sont réversibles et à l'équilibre lorsque le plateau est atteint. Le nombre de cellules sorbées a ainsi été déterminé par différence entre la hauteur du créneau et celle du plateau tandis que le nombre de cellules à l'équilibre correspond au nombre de cellules au niveau du plateau. Les isothermes de sorption des cellules des deux bactéries modèles sur le sable d'Hostun sont présentées sur la Figure IV-20.



**Figure IV-20 : Isotherme d'adsorption des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 et de *Escherichia coli* K12Dh5a sur le sable d'Hostun. Données déduites des expériences de transfert : la concentration en cellules sorbées correspond à la différence entre la hauteur du créneau et celle du plateau et le nombre de cellules à l'équilibre correspond à la hauteur du plateau.**

Pour *C. metallidurans* CH34 on atteint rapidement un plateau indiquant une saturation des sites de sorption dans la colonne de sable à partir d'une concentration cellulaire injectée de  $4 \cdot 10^8$  UFC/mL. Pour *E. coli* K12Dh5 $\alpha$  on atteint un plateau uniquement pour les plus fortes concentrations cellulaires d'injection (à partir de  $2 \cdot 10^9$  UFC/mL). Les profils de concentration des cellules bactériennes retenues dans la colonne ont été mesurés pour des concentrations d'injection de  $4 \cdot 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> et  $9 \cdot 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> pour *C. metallidurans* CH34 et de  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> et  $4.5 \cdot 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> pour *E. coli* K12Dh5 $\alpha$ , et sont présentés sur la Figure IV-21.

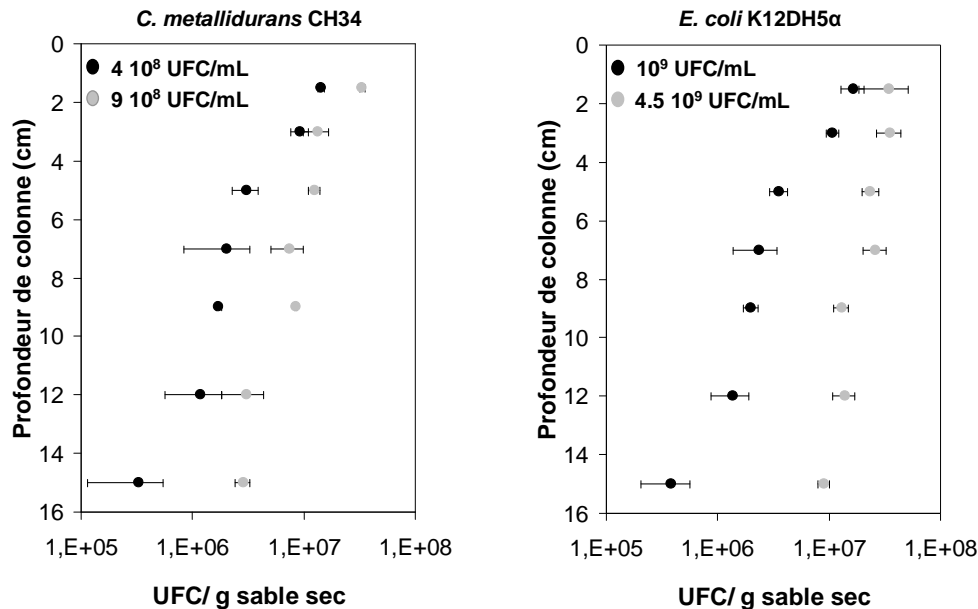


Figure IV-21 : Profils verticaux de rétention des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 et d'*Escherichia coli* K12Dh5 $\alpha$ , à faible et forte concentration d'injection, en fin d'expérience de transfert en colonne de sable d'Hostun (V/V0 =4). Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type calculé sur des duplicats.

Les profils de concentration des cellules bactériennes retenues dans la colonne ont été mesurés pour des concentrations d'injection de  $4 \cdot 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> et  $9 \cdot 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> pour *C. metallidurans* CH34 et de  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> et  $4.5 \cdot 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> pour *E. coli* K12Dh5 $\alpha$ , et sont présentés sur la Figure IV-21. On observe que l'augmentation des concentrations d'injection modifie les profils de rétention. En effet on observe que les cellules bactériennes sont retenues de manière plus homogène le long de la colonne confirmant la saturation des sites de rétention de la matrice observée sur les isothermes présentées précédemment (Figure IV-20).

#### IV-3-6. Effet du milieu poreux sur le transport des bactéries modèles

Les résultats obtenus dans notre étude ont été comparés avec ceux obtenus par Guiné (2006) réalisés avec les mêmes bactéries, pour des conditions hydrodynamiques similaires, mais en colonnes de sable de Fontainebleau (Figure IV-22).



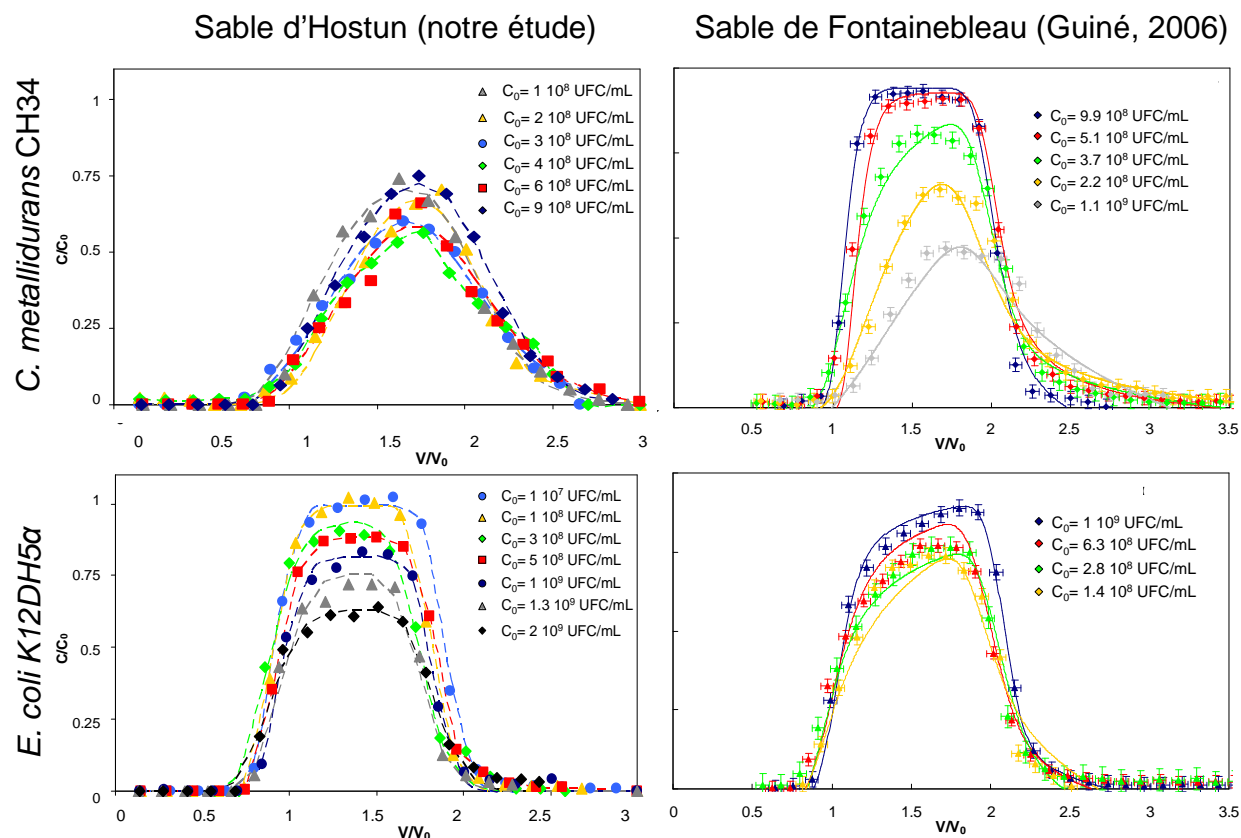


Figure IV-22 : Effet du milieu poreux, sable de Fontainebleau ou sable d'Hostun, sur le transport des cellules de *Escherichia coli* K12DH5a et de *Cupriavidus metallidurans* CH34 à différentes concentrations cellulaires d'injection. Les résultats concernant le transport dans le sable de Fontainebleau sont issus de Guiné (2006).

Les résultats montrent un effet important du milieu poreux sur le transport des cellules des deux bactéries. En effet le comportement des deux bactéries modèles est très différent dans les deux matrices. Guiné (2006) a systématiquement observé une diminution du bilan de masse lorsque la concentration en cellules injectées diminue pour les deux bactéries. Pour *C. metallidurans* CH34, cette diminution est d'un facteur 2 (de 90 à 47 %) pour une diminution du nombre de cellules injectées d'un facteur 9 ( $9.9 \cdot 10^8$  à  $1.1 \cdot 10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ). Pour *E. coli* DH5a la diminution est moindre : les bilans de masse évoluent de 90 à 70 % pour une diminution du nombre de cellules injectées d'un facteur 7 ( $1.0 \cdot 10^9$  à  $1.4 \cdot 10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ). Ces résultats indiquent une mobilisation croissante des cellules dans la colonne avec l'augmentation de la concentration d'injection due à une possible saturation des sites de sorption des colloïdes bactériens sur le sable de Fontainebleau. Dans le sable d'Hostun, on retrouve ces résultats, caractéristiques d'un effet blocking, uniquement pour les plus fortes concentrations cellulaires, indiquant que la concentration de sites de rétention bactérienne au niveau de la matrice est plus importante pour le sable d'Hostun que pour le sable de Fontainebleau. De plus les gammes de concentrations cellulaires testées par Guiné (2006) sont plus étroites que celles de notre étude, il aurait donc été intéressant de tester des concentrations cellulaires d'injection plus faibles dans le sable de Fontainebleau.

Afin de mieux comprendre les différences observées, nous avons comparé certaines propriétés physicochimiques des deux matrices. A l'œil nu les grains de sables d'Hostun apparaissent plus grossiers et également plus transparents que ceux de Fontainebleau (Figure IV-23).



Figure IV-23: Photographie du sable de Fontainebleau (gauche) et du sable d'Hostun (droite).

L'observation en microscopie optique (Zeiss) des deux matrices sableuses confirme la taille plus importante des grains de sable d'Hostun par rapport à ceux du sable de Fontainebleau (Figure IV-24).

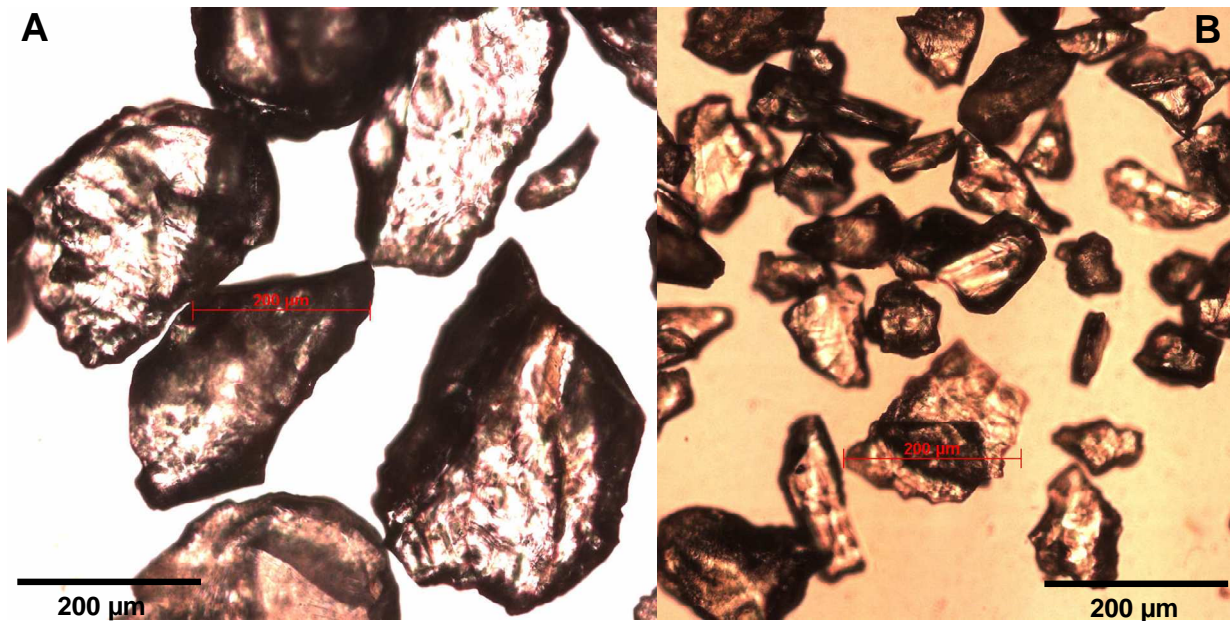


Figure IV-24 : Observation de la de taille et de la forme de grains de sable d'Hostun (A) et de Fontainebleau (B) en microscopie optique (Zeiss).

Nous avons alors mesuré la distribution de taille des grains des deux sables en granulométrie laser (Master sizer 2000, Malvern Instruments). Les résultats obtenus, Figure IV-25, confirment que les grains de sable de fontainebleau ( $d_{50} = 120 \mu\text{m}$ ) sont nettement plus fins que ceux du sable d'Hostun ( $d_{50} = 280 \mu\text{m}$ ).

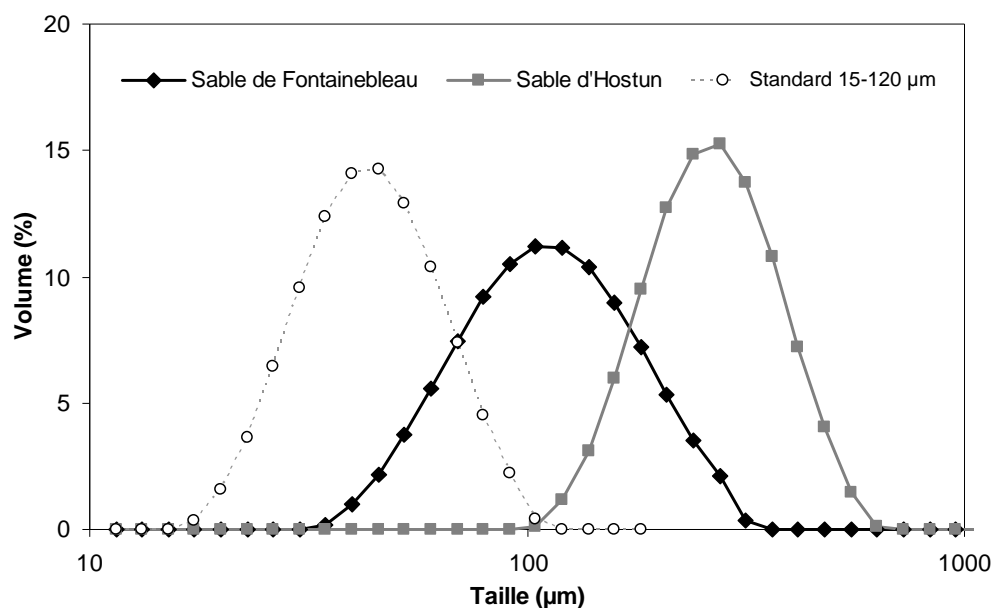


Figure IV-25: Distribution de taille des grains de sable de Fontainebleau, de sable d'Hostun et d'un standard de 50 µm (15-120 µm). Les valeurs correspondent à la moyenne de triplicats.

De plus le potentiel zêta du sable de Fontainebleau est de -68 mv (Guiné, 2006). Le sable de Fontainebleau est donc plus électronégatif que le sable d'Hostun (potentiel zêta de -20mV) ce qui se traduit par la présence d'une plus forte barrière d'énergie entre les cellules bactériennes et le sable de Fontainebleau en comparaison avec le sable d'Hostun.

#### IV-3-7. Etude du transport de bactéries en mélange en colonne de sable d'Hostun

Les résultats des expériences de transport de mélange de bactéries en colonnes sont présentés dans la Figure IV-26. La concentration initiale des populations bactériennes était de  $5 \cdot 10^8$  et de  $2.5 \cdot 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> pour *E. coli* K12Dh5α et *C. metallidurans* CH34, respectivement. Ces résultats montrent clairement que l'on peut quantifier spécifiquement les deux populations bactériennes en mélange dans les effluents de colonnes, même si les analyses sont compliquées pour *C. metallidurans* CH34 du fait de la nécessité de colorer les cellules pour les rendre fluorescentes. Ce protocole semble donc transposable à d'autres types de bactéries ou microorganismes. Même si idéalement, les analyses seraient largement simplifiées si nous disposions d'une souche de *C. metallidurans* CH34 fluorescente (gfp, yfp, Dsred...). En conditions de mélange des deux populations bactériennes, le bilan de masse en sortie de colonne d' *E. coli* K12Dh5α n'est pas modifié (de 90 à 92%), alors qu'il diminue fortement pour *C. metallidurans* CH34 (de 75 à 25%). Concernant *C. metallidurans* CH34, on note que non seulement le plateau est moins élevé mais également que le front descendant est plus précoce en présence de cellules de *E. coli* K12Dh5α.

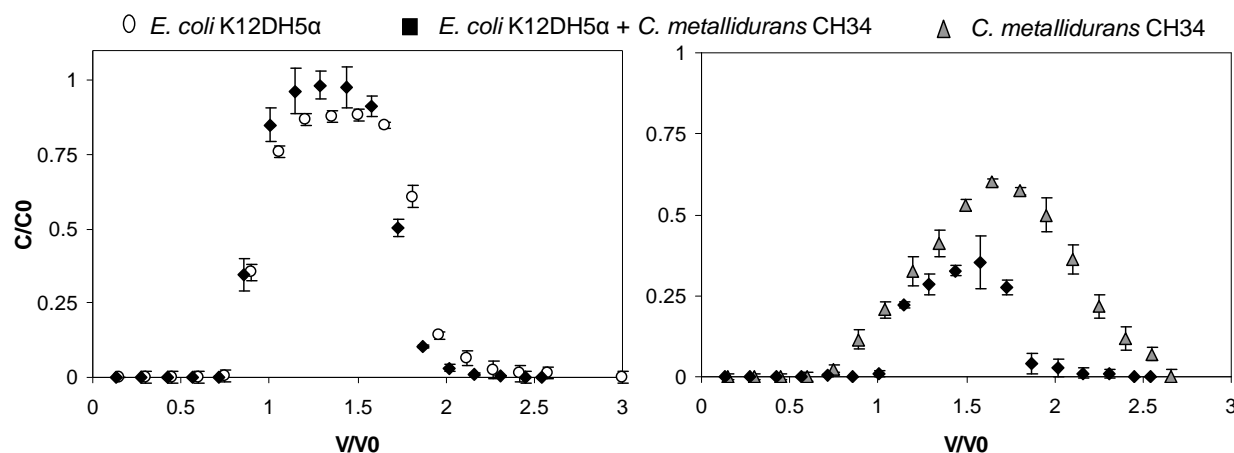


Figure IV-26: Courbes de percée des cellules de *Escherichia coli* K12DH5α seules ou en présence de *Cupriavidus metallidurans* CH34 (A) et des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 seules ou en présence de *Escherichia coli* K12DH5α (B) en colonnes de sable d'Hostun. Les barres d'erreurs ont été calculées sur des triplicats.

## IV-4. Discussion

### IV-4-1. Utilisation de la cytométrie en flux

Nos résultats ont montré l'intérêt de l'utilisation de la cytométrie en flux pour l'étude du transfert de bactéries dans les milieux poreux, que ce soit avec des cellules colorées avec des fluorochromes ou, mieux, intrinsèquement fluorescentes grâce à un gène de protéine fluorescente. L'avantage principal de cette méthode est que l'utilisation de seuils de fluorescence permet de compter spécifiquement les cellules d'intérêt en s'affranchissant des bactéries autochtones, naturellement présentes dans le milieu. L'automatisation des analyses permet également un gain important de temps et de précision en comparaison avec les méthodes analytiques classiques. Toutefois cette méthodologie reste délicate à utiliser car sensible à divers facteurs tels que le bruit de fond en particules, la concentration en bactéries ou encore le temps de contact avec le fluorochrome. Il faut donc optimiser la méthode avant son application et surtout veiller à répliquer les essais. Même si l'utilisation de sondes fluorescentes pour l'étude du transport de cellules bactériennes n'est pas encore optimale, car demandant beaucoup de précautions, elle laisse entrevoir des perspectives très intéressantes, notamment pour les études à faibles concentrations cellulaires ou avec des mélanges de bactéries pour lesquelles les méthodes classiques sont inopérantes. Jacobs (2007) avait déjà eu recours à l'utilisation de la cytométrie en flux pour l'étude du transport de cellules bactériennes. Dans son étude, il avait également travaillé avec une souche portant un plasmide fluorescent et avait obtenu des résultats satisfaisants, confirmés par les résultats obtenus avec *E. coli* K12Dh5α. En utilisant un kit contenant du Syto 9 utilisé après le passage des cellules en colonne, il avait observé la présence d'événements « parasites » dus à la présence de cellules bactériennes indésirables dans les matrices utilisées qui n'étaient pas stériles, comme dans notre étude.

### IV-4-2. Effet du type de souche bactérienne sur le transport

Les résultats obtenus montrent que les deux bactéries présentent des mécanismes de transport très différents dans le sable d'Hostun. Les cellules de *E. coli* K12DH5α présentent

une mobilité importante avec plus de 90% de taux d'élution et aucun retard significatif par rapport à un traceur de l'eau. Les cellules de *C. metallidurans* CH34 sont fortement retenues dans le sable et retardées par rapport à celles de *E. coli* K12DH5 $\alpha$ . Ces différences peuvent d'une part s'expliquer par des facteurs biotiques comme par exemple des différences de nature et de propriétés de paroi cellulaire comme l'hydrophobie, la charge de surface, la taille cellulaire ou la composition de la membrane (Park et al., 2010). Concernant l'hydrophobie, Guiné (2006) a montré que ces deux souches sont plutôt hydrophiles, on suppose que cette propriété de surface n'est pas à l'origine des différences observées, d'autant plus qu'il n'existe pas de consensus dans la littérature sur l'effet de l'hydrophobie des cellules bactériennes sur leur transport. Concernant le paramètre taille, d'un point de vue physique, les plus petites cellules sont sensées être plus facilement transportées car moins sensibles aux mécanismes de filtration (Cumbie et McKay, 1999). Toutefois, certains auteurs ont montré que le taux de rétention des colloïdes pouvait augmenter avec la diminution de leur taille (Song et al., 1994; Ryan et Elimelech, 1996). En effet, les petites cellules ont des surfaces spécifiques plus importantes ce qui augmente leur capacité de rétention par liaisons électrostatiques et pourrait expliquer la plus forte rétention de *C. metallidurans* CH34. Concernant la charge de surface des cellules, les mesures de potentiel zêta montrent que les cellules de *E. coli* K12DH5 $\alpha$  sont beaucoup plus négativement chargées que les cellules de *C. metallidurans* CH34 plus proches de la neutralité. Nos calculs de profils d'énergie d'interactions basés sur la théorie DLVO (Figure IV-7) ont montré que cette différence de propriété peut expliquer la plus forte rétention observée pour les cellules de *C. metallidurans* CH34 (Haznedaroglu et al., 2009; Kim et al., 2009). Il est également possible que des différences dans la structure et dans la composition des membranes cellulaires soient responsables des différences de mobilité observées en colonne entre les deux cellules (Yee et Fein, 2002; Park et al., 2010).

Les conditions physicochimiques imposées dans nos essais (sable et cellules négativement chargés) sont défavorables au dépôt, d'après la théorie DLVO. Dans ces conditions, il est surprenant d'observer autant de rétention cellulaire, notamment pour *C. metallidurans* CH34. D'autres auteurs ont déjà observé des phénomènes similaires de dépôt colloïdal en conditions défavorables. Il a alors été postulé que le second minimum d'énergie pouvait être responsable de la rétention des bactéries dans le milieu poreux (Meinders, 1995; Redman et al., 2004; Jacobs, 2007). Nos résultats pourraient donc s'expliquer en partie par le fait que les cellules de *C. metallidurans* CH34 sont moins négativement chargées que celles de *E. coli* K12DH5 $\alpha$  et qui présentent un second minimum d'énergie plus important. D'autres études (Truesdail et al., 1998; Jacobs, 2007; Vitorge, 2010) expliquent cette rétention des colloïdes par l'hétérogénéité des grains de la matrice. Ces hétérogénéités forment alors des zones favorables au dépôt colloïdal dans lesquelles les bactéries peuvent se déposer dans le premier ou le second minimum d'énergie. On ne peut pas exclure ce type de processus pour expliquer la rétention de nos deux bactéries modèles dans le sable d'Hostun, étant donné la forme irrégulière et anguleuse de ses grains. Au sein du milieu il existe naturellement des zones où les flux d'eau sont nuls (eau immobile) et où les bactéries ou les colloïdes peuvent diffuser et se retrouver piégés ou retardés dans leur transfert (Truesdail et al., 1998; Jacobs, 2007; Johnson et al., 2007; Vitorge, 2010). Jacobs (2007) a montré par imagerie que les bactéries pouvaient être piégées au niveau de microcavités (creux) et de canaux présents à la surface des grains de sable. Le mécanisme de straining, défini comme le piégeage des colloïdes dans les pores trop étroits pour permettre leur passage (Foppen et al., 2005, 2007; Auset et Keller, 2006), ne peut pas être négligé non plus pour expliquer la rétention des bactéries. De manière classique, les auteurs considèrent que le mécanisme de straining n'a lieu que lorsque le rapport taille des colloïdes ( $d_p$ ) sur taille des grains ( $d_{50}$ ) est supérieur à 0.05 (Redman et al., 2004). Or Bradford et al. (2003) ont montré que même pour des valeurs



inférieures, les phénomènes de straining sont possibles, notamment à cause de l'hétérogénéité des grains. Ils considèrent que le straining devient significatif lorsque  $d_p/d_{50} > 0.005$ . Redman et al. (2004), dans leur étude, considèrent le straining comme une explication potentielle de la rétention des bactéries étudiées alors que le rapport  $d_p/d_{50}$  est de 0.009. Dans notre étude les rapports taille des colloïdes sur taille des grains sont de 0.008 et 0.004 pour *E. coli* K12Dh5 $\alpha$  et *C. metallidurans* CH34, respectivement. Bien que ces valeurs soient plutôt faibles, on ne peut pas exclure totalement ce mécanisme pour expliquer la rétention cellulaire observée, d'autant plus que les profils de concentration de cellules retenues dans les colonnes sont caractéristiques de ce type de mécanisme (Bradford et al., 2003).

La multitude de mécanismes possibles pour expliquer la rétention de *C. metallidurans* CH34 dans le sable d'Hostun (et dans une moindre mesure *E. coli* K12Dh5 $\alpha$ ) rend difficile la description précise des mécanismes en jeu. Une étude plus approfondie des mécanismes de dépôt est nécessaire, par exemple en faisant varier la force ionique, pour identifier le ou les mécanismes prépondérants entre le straining, le piégeage géométrique dû à l'hétérogénéité et l'angulosité des grains de sable et surtout la rétention dans le second minimum d'énergie.

#### IV-4-3. Effet de la concentration cellulaire sur le transport

Grâce à la mise au point de la méthodologie de cytométrie en flux, nous avons pu étudier l'effet de concentration cellulaire sur le transport de bactéries pour une gamme de concentration allant de  $10^7$  à  $4.5 \cdot 10^9$  cellules.mL<sup>-1</sup> pour *E. coli* K12Dh5 $\alpha$  et de  $10^8$  à  $9 \cdot 10^8$  cellules.mL<sup>-1</sup> pour *C. metallidurans* CH34. Les résultats obtenus sont résumés dans la Figure IV-27 qui présente l'évolution du taux de restitution cellulaire, ou bilan de masse, en fonction de la concentration cellulaire injectée pour les deux bactéries modèles. Pour les deux bactéries on observe des résultats assez similaires: tout d'abord une diminution du bilan de masse avec l'augmentation de la concentration cellulaire d'injection puis une augmentation du bilan de masse lorsque la concentration cellulaire d'injection devient plus importante.

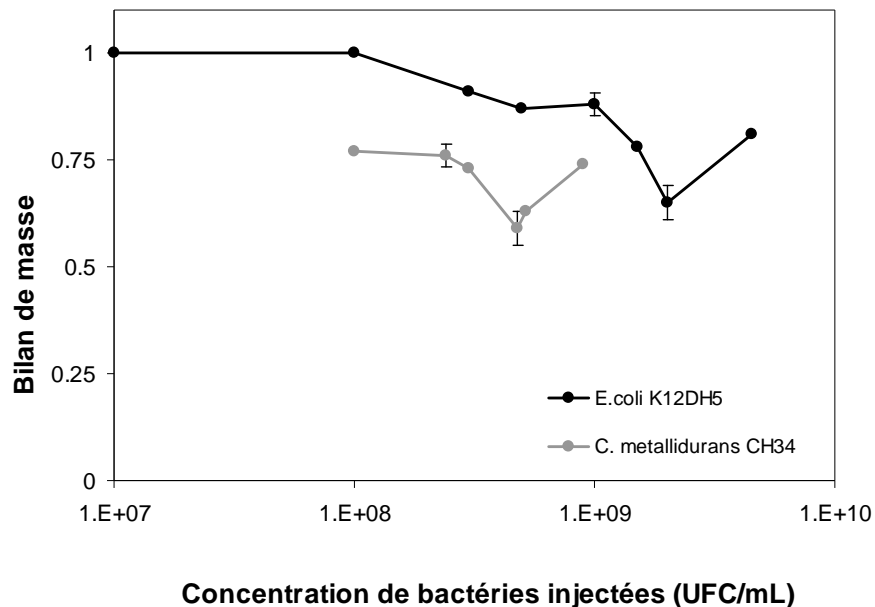


Figure IV-27: Effet de la concentration cellulaire d'injection sur le taux de transfert (bilan de masse) de cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 et de *Escherichia coli* K12Dh5 $\alpha$  mesurés en sortie de colonne de sable d'Hostun et de sable de Fontainebleau (Guiné, 2006).

Ce type d'effet a déjà été observé précédemment et plusieurs hypothèses permettent d'expliquer ces résultats (Bradford et Bettahar, 2005; Vitorge, 2010). Aux faibles concentrations les cellules passent au centre des pores ou la vitesse de fluide est rapide et limite les contacts avec la matrice et donc le dépôt induisant des taux de restitution très élevés comme observés dans notre étude aux plus faibles concentrations. Lorsque la concentration d'injection augmente, on observe dans un premier temps que le bilan de masse diminue en relation avec une augmentation du dépôt cellulaire, caractéristique d'un effet « ripening ». Des résultats similaires ont déjà été observés pour des particules de latex (Bradford et Bettahar, 2005), des nanoparticules de silice (Vitorge, 2010), ou des bactéries (Foppen et al., 2007). Il semble que le taux de straining augmente lorsque la concentration d'injection augmente expliquant alors l'augmentation de la rétention avec l'augmentation de la concentration de cellules injectées. Pour expliquer ces phénomènes leurs auteurs ont supposé que lorsque la concentration de colloïdes augment, ceux-ci sont préférentiellement:

- déviés des principaux chemins percolants et se retrouvent dans les zones où la vitesse de fluide est plus faible voire nulle et se retrouvent donc piégés.
- acculés sur les bords des pores où la vitesse locale est plus faible car les colloïdes se repoussent entre eux et sont donc plus susceptibles d'être retenus (Vitorge, 2010).

Dans notre étude, il semble que l'on observe dans un premier temps un mécanisme de type ripening (Camesano, 1999): l'augmentation de la concentration d'injection entraîne une diminution du bilan de masse en sortie de colonne qui peut s'expliquer par une occupation progressive des sites de rétention de la matrice. Puis dans un second temps, on observe une augmentation du bilan de masse avec l'augmentation de la concentration de cellules injectées, caractéristique d'un effet blocking (Camesano, 1999). Ce phénomène a déjà été observé dans la littérature (Foppen et Schijven, 2006; Guiné, 2006; Vitorge, 2010) et s'explique par une saturation des sites de rétention avec l'augmentation de la quantité de colloïdes injectés, ce qui limite leur capacité de rétention. Ces résultats sont confirmés par les isothermes d'adsorption des deux bactéries modèles sur le sable d'Hostun (Figure IV-20) qui montrent que les bilans de masse bactériens augmentent avec la concentration d'injection lorsque la saturation de sites de rétention est atteinte. La mesure des profils verticaux de concentration des cellules bactériennes à forte concentration dans le sable (Figure IV-21) a confirmé cette saturation progressive avec les profils qui deviennent plus homogènes lorsque la concentration augmente. Une fois la saturation atteinte, tous les sites de sorption sur le sable sont alors occupés par les cellules bactériennes et les cellules suivantes ne sont donc plus retenues, faute de sites de rétention disponibles (effet blocking), expliquant ainsi l'augmentation des bilans de masse observée pour les plus fortes concentrations d'injection pour les deux bactéries. La Figure IV-20 montre que la quantité de sites de rétention est supérieure pour *E. coli* K12Dh5α ce qui explique que l'effet concentration est plus important que pour *C. metallidurans* CH34. En effet le nombre de cellules bactériennes nécessaires pour saturer l'ensemble des sites de rétention est plus important et l'effet de concentration est d'autant plus important. On remarque également que pour *C. metallidurans* CH34 la plupart des expériences ont été réalisées proches des conditions de saturation des sites et avec de faibles différences de concentration ce qui peut expliquer les résultats obtenus. L'augmentation des bilans de masse avec l'augmentation de la concentration initiale en cellules peut également s'expliquer, au moins en partie, par une augmentation des collisions entre les cellules lorsque la concentration cellulaire d'injection augmente (dus à une plus grande abondance cellulaire) qui permet de remobiliser les bactéries préalablement retenues de manière réversible (Haznedaroglu et al., 2009).

#### IV-4.4. Effet du milieu poreux sur le transport de bactéries

Réalisés dans des conditions hydrodynamiques similaires, la comparaison du transport des deux bactéries modèles dans deux sables différents a permis de montrer que la nature du milieu poreux contrôle aussi le transport des colloïdes bactériens. En effet, nos résultats montrent que les deux bactéries modèles se comportent différemment dans les deux matrices : sable d'Hostun et sable de Fontainebleau (Guiné, 2006). En comparant les résultats obtenus avec les deux sables, nous avons montré que le sable de Fontainebleau est fortement électronégatif, son potentiel zêta est de  $-68\text{mv}$  alors qu'il est d'environ  $-20\text{mv}$  pour le sable d'Hostun. Cette différence implique des forces répulsives plus importantes entre le sable de Fontainebleau et les cellules bactériennes par rapport au sable d'Hostun, et limitent ainsi la rétention électrostatique des cellules dans le sable de Fontainebleau. De plus en étudiant la géométrie des grains de sable, on observe que les grains de sable de Fontainebleau sont plus petits que ceux du sable d'Hostun ce qui se traduit par des pores plus étroits dans le sable de Fontainebleau. Cette caractéristique peut suffire à expliquer les différences observées sur le transport des cellules bactériennes entre les deux sables. Dans le sable de Fontainebleau il est possible que le straining soit plus important ce qui explique que les cellules de *E. coli* K12Dh5 $\alpha$ , plus grosses, sont plus retenues que celle de *C. metallidurans* CH34. En effet les rapports  $dp/d50$  sont de 0.02 et 0.01 pour *E. coli* K12Dh5 $\alpha$  et *C. metallidurans* CH34, respectivement, et sont en accord avec la possibilité d'observer du straining (Redman et al., 2004). Au contraire dans le sable d'Hostun où le straining est moins important, c'est plutôt l'électronégativité des cellules qui semblent contrôler leur transport expliquant alors pourquoi les cellules de *C. metallidurans* CH34 sont plus retenues. Il faut toutefois noter que concernant le sable de Fontainebleau, les résultats montrent que la plupart des expériences n'ont pu être réalisées qu'à proximité du plateau de saturation des sites, il serait alors intéressant d'étudier le transport des deux bactéries modèles à des concentrations d'injection plus faibles, comme réalisé pour le sable d'Hostun. Toutefois, les différences observées entre les deux matrices mettent en avant l'importance de la composition et de la géométrie du milieu dans le contrôle du transport de cellules bactériennes. En effet, les deux matrices, bien que relativement simples, induisent des mécanismes de transport des bactéries différents.

#### IV-4.5. Transport de bactéries en mélange en colonnes de sable d'Hostun

L'utilisation de la cytométrie en flux nous a également permis d'étudier le transport des cellules bactériennes en conditions de mélange. Pour des raisons de temps et de commodité, nous nous sommes limités à l'étude d'un mélange de suspension cellulaires de  $\text{DO}_{600}=1$ , soit des concentrations finales respectives de  $5 \cdot 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$  pour *E. coli* K12Dh5 $\alpha$  et de  $2 \cdot 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$  pour *C. metallidurans* CH34. Les résultats obtenus montrent que la présence de *C. metallidurans* CH34 ne semble pas modifier le transport de *E. coli* K12Dh5 $\alpha$  alors que l'on observe une rétention plus importante des cellules de *C. metallidurans* CH34 en présence de *E. coli* K12Dh5 $\alpha$ , suggérant que la rétention de cellules de *E. coli* K12Dh5 $\alpha$ , même faible, contribue ensuite à la rétention de cellules de *C. metallidurans* CH34. Peu d'études se sont intéressées au transport de mélange de bactéries, en raison notamment de la difficulté de quantification de chaque bactérie en présence d'autres bactéries. Grâce à un marquage radioactif des bactéries ( $^{35}\text{S}$  et  $^{14}\text{C}$ ), Dong et al. (2002) ont réalisé des expériences de transport de mélange de deux bactéries qui ont montré qu'en mélange, le dépôt des deux bactéries étudiées était augmenté par rapport au cas où elles étaient seules. Plus récemment, Stumpp et al. (2011) ont étudié le transport de trois bactéries seules ou en mélange. Les auteurs ont obtenus des résultats très contrastés suivant les



bactéries. Dans certains cas le mélange induit une diminution du dépôt (*Pseudomonas.sp* #5) alors que dans d'autres cas, il induit une forte augmentation du dépôt (*Klebsiella oxytoca*), comme observé pour *C. metallidurans* CH34. Enfin dans un dernier cas, aucun effet n'est observé (*Burkholderia cepacia*) comme pour *E. coli* K12Dh5α dans notre étude. Comme souvent avec du matériel biologique, il est difficile d'établir facilement des mécanismes généraux transposables et il semble indispensable d'étudier le comportement de chaque espèce au cas par cas. De ce point de vue la cytométrie en flux peut être un outil vraiment intéressant, notamment si les bactéries étudiées sont facilement détectables via des marquages de fluorescence (gènes *yfp*, *gfp*, *rfp*). On peut tout de même tenter de formuler quelques hypothèses pour expliquer les effets mélange observés, on peut penser que les cellules de *C. metallidurans* CH34, étant plus petites que celles de *E. coli* K12Dh5α, elles subissent des collisions avec les cellules de *E. coli* K12Dh5α qui favoriseraient leur rapprochement avec les grains où l'on a vu qu'elles étaient susceptibles d'être retenues, au niveau du minimum secondaire d'énergie. Obtenir les profils de rétention pourrait renseigner sur la distribution des cellules de *C. metallidurans* CH34 et de *E. coli* K12Dh5α dans la colonne et donc mieux comprendre les mécanismes mis en jeu. Faute de temps, nous n'avons pas pu les mesurer (mise au point technique nécessaire) et cela constitue donc une perspective intéressante à notre étude.

#### IV-5. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était d'étudier les mécanismes de transport des bactéries modèles en milieu poreux dans différentes conditions de concentrations et en mélange pour pouvoir comprendre leur mobilité et par la suite leur rôle potentiel dans le transport facilité de métaux lourds. En effet, selon les conditions physicochimiques du milieu, les bactéries peuvent être plus ou moins mobiles et peuvent donc transporter ou non les métaux après les avoir biosorbés ou accumulés ou simplement en modifiant leur rétention dans le milieu en changeant notamment les propriétés géochimiques de la solution mobile. Grâce au développement d'une méthodologie de comptage cellulaire basée sur la cytométrie en flux et particulièrement adaptée aux faibles concentrations et aux mélange de bactéries, nous avons pu étudier le transport de bactéries en conditions physicochimiques défavorables au dépôt (force ionique faible et pH6) afin de favoriser la forte mobilité des bactéries modèles dans le sable d'Hostun, condition indispensable dans un contexte de bioremédiation par bioaugmentation des sols pollués aux métaux. Dans de telles conditions, les cellules et le sable sont négativement chargés et d'après la théorie DLVO, les forces répulsives sont dominantes. Dans ces conditions défavorables à l'adhésion, nous avons observé une mobilité très différente des deux bactéries modèles. Les cellules de *E. coli* K12Dh5α sont transportées quasiment sans dépôt (> 90% de bilan de masse) tandis que les cellules de *C. metallidurans* CH34 sont nettement retardées ( $R=1.35$ ) et fortement retenues dans le sable d'Hostun (60% de bilan de masse). Bien que le sable soit considéré comme uniforme, la matrice présente des sites favorables à l'adhésion des cellules. En particulier, la géométrie du réseau poral semble être responsable du piégeage physique des bactéries notamment pour *E. coli* K12Dh5α qui est plus grosse que *C. metallidurans* CH34. Les différences de mobilité observées s'expliquent par des différences de propriétés de surface des deux bactéries (charge de surface, hydrophobie, composition...) qui leur confèrent des propriétés d'interactions différentes telles que nous avons pu le prédire avec la théorie DLVO. Ainsi les cellules de *C. metallidurans* CH34 qui sont peu négativement chargées (-10mv) peuvent être retenues dans un puit d'énergie secondaire dont la profondeur est plus importante que pour *E. coli* K12Dh5α qui est beaucoup plus électronégative (-50mv), expliquant ainsi les différences observées.

Notre étude sur l'effet de la concentration cellulaire d'injection sur la mobilité des bactéries a montré de manière originale un effet non linéaire de l'augmentation de la concentration d'injection des deux bactéries sur leur mobilité. Nous avons ainsi mis en évidence un effet en deux phases séparées par une concentration seuil : en dessous de cette concentration, l'augmentation de la concentration d'injection en bactéries induit une augmentation du dépôt cellulaire (diminution de la mobilité) et au dessus, on observe une réduction du dépôt et donc une augmentation de la mobilité.

Ces résultats sont d'autant plus intéressants qu'une étude récente sur le transport des mêmes bactéries modèles mais dans du sable de Fontainebleau (Guiné, 2006) a montré un comportement opposé de ces bactéries contrôlé principalement par un processus de blocking qui se traduit par une saturation rapides des sites de rétention. Nous montrons ainsi que le transport des bactéries est contrôlé par les propriétés intrinsèques des bactéries, mais également par la nature du milieu poreux et en particulier par la géométrie de son réseau poral.

Enfin, nous nous sommes également intéressés au transport d'un mélange de bactéries afin d'étudier le rôle des interactions entre les cellules sur leur mobilité respective. Cette étude a montré qu'en présence d'une autre population bactérienne, la mobilité d'une bactérie pouvait changer. Ceci a été particulièrement observé pour *C. metallidurans* CH34 dont le dépôt augmente d'un facteur 2 en présence de cellules de *E. coli* K12Dh5a qui, elles, ne sont pas sensibles à la présence de *C. metallidurans* CH34. Nos résultats sont cohérents avec les quelques études qui se sont intéressées au transport de mélange de bactéries, et permettent d'affirmer que l'effet mélange cellulaire sur la mobilité des bactéries est fortement dépendant des espèces bactériennes en présence. Il s'avère donc nécessaire d'étudier ces phénomènes au cas par cas. Pour cela, l'utilisation de la cytométrie en flux appliquée à des bactéries intrinsèquement fluorescentes est un outil prometteur et puissant.



**CHAPITRE V    Etude et modélisation du transport  
facilité des métaux par les bactéries en colonne de  
sable**



## V-1. Introduction

En dépit de leur faible proportion en masse dans les sols, les particules colloïdales participent de manière non négligeable à la dissémination des polluants (McCarthy et Zachara 1989; Mills, Liu, et Fong 1991; Ryan et Elimelech 1996; Kretzschmar et al.; 1999; Ledin, 2000; Sen et Khilar 2006). Si les contaminants s'adsorbent fortement sur des colloïdes mobiles, alors ces polluants peuvent être transportés rapidement et sur de longues distances. Ce mécanisme est connu sous le nom de transport facilité des polluants par les colloïdes. Des études récentes montrent qu'il ne s'agit pas seulement d'une « facilitation » du transport mais davantage d'une « association » entre les polluants et les colloïdes. En effet, le transport ne concerne pas uniquement l'accélération du transfert des contaminants par les colloïdes mais également leur éventuel retard induit par les processus d'immobilisation des colloïdes (Bekhit et al., 2009).

Dans les sols, l'existence et l'importance du transfert colloïdal a été mis en évidence pour plusieurs polluants, ions et macromolécules : en premier pour les radionucléides, mais aussi pour les cations alcalins, divers éléments traces, oxyanions et composés organiques polaires ou non polaires. Ces études montrent que les colloïdes adsorbent les ions et molécules qui peuvent être ou non des polluants et peuvent ainsi contribuer à leur dissémination dans les milieux poreux. Concernant des polluants à l'état de trace, le transport sur des vecteurs colloïdaux peut même s'avérer être le principal mode de transport dans les sols mais aussi en milieu aquatique où ils constituent le principal vecteur de polluants (McCarthy et Zachara 1989; Pédrot et al. 2008). Ainsi, Citeau et al. (2003) ont montré que les colloïdes sont impliqués dans la mobilisation de métaux lourds et que l'importance de ce mécanisme dépend des propriétés chimiques du cation métallique considéré. Ainsi le plomb est transporté principalement sous forme colloïdale, alors que le Zn et le Cd sont mobilisés sous forme dissoute et colloïdale. Cette étude rejoint celle de Karathanasis et al. (2005) qui ont montré que la présence de colloïdes pouvait augmenter de 5 à 50 fois la vitesse de transport du Cu et du Zn et celle du Pb de 10 à 3000 fois. D'autres études se sont focalisées sur l'effet des propriétés des sols sur le transport de métaux tel Yin et al (2010) qui ont mis en évidence le transport facilité de Pb par les colloïdes dans deux sols aux propriétés physicochimiques différentes. D'autres études en colonnes de laboratoire ont montré que les métaux plus mobiles, tels que le zinc, le cadmium, le cuivre ou le nickel pouvaient également être transportés de manière facilitée par des colloïdes inorganiques. Ainsi, Keller and Domergue (1996) ont montré que dans les solutions de sol issues d'un podzsol, la fraction colloïdale pouvait concerner jusqu'à 40 % du flux total de Cu, de Zn et de Cd. Karathanasis (1995) a observé une augmentation de 5 à 50 fois du transport de zinc en présence des colloïdes de smectite dans une colonne de sol. De même, Sen et al. (2002) ont montré l'importance de la mobilisation et de la migration des particules colloïdales de kaolin sur le transport du nickel dans un milieu poreux sableux. Ces différentes études ont largement contribué à montrer le rôle prépondérant des colloïdes dans la mobilisation des métaux. Toutefois, le rôle potentiel des bactéries dans le transfert facilité des métaux dans l'environnement, qui a été discuté par McCarthy and Zachara (1989), est encore très peu étudié malgré la forte réactivité de ce compartiment du sol. Ainsi, peu d'études de laboratoire ou de terrain ont concerné les cellules bactériennes considérées comme des biocolloïdes qui, de part leur propriétés de surface, sont sujets aux mêmes processus physicochimiques que les colloïdes inorganiques. Ces biocolloïdes subissent en plus des processus strictement biologiques qui peuvent affecter leur réactivité, leur mobilité et par conséquent le transfert associé de métaux (Sen *et al.*, 2004; Sen *et al.*, 2005; Foppen and Schijven, 2006). La surface de ces colloïdes biotiques, tels que les bactéries, est généralement chargée négativement et

comporte de nombreux groupements fonctionnels susceptibles de fixer les métaux cationiques. Pang et al.(2005) ont ainsi montré que la présence de cellules de *E.coli* augmente la solubilité du Cd alors que les cellules de *B. subtilis* semblent co-transporter le Cd. Chen et al. (1995) ont fait le bilan de la mobilisation des métaux par des polymères bactériens et ont montré que des polymères extracellulaires pouvaient être utilisés pour décontaminer efficacement les eaux souterraines et les sols pollués par des métaux. De même, Yee et Fein (2002), ont montré que sous certaines conditions de pH et de minéralogie, les cellules de *B. subtilis* sont mobiles et peuvent favoriser le transport du cadmium sorbé sur leur surface. Guiné et al. (2003) ont montré que les cellules de *C. metallidurans* CH34 et de *E. coli* K12DH5a accélèrent le transport du Zn et du Cd dans un milieu poreux simple et inerte : le sable de Fontainebleau.

La mobilité des contaminants dans le sol dépend de leur distribution entre la phase solide immobile et la phase aqueuse mobile. Actuellement, il est admis que le transfert des polluants dans les sols résulte du couplage de trois processus : le transport dissous, le transport colloïdal et les mécanismes de rétention sur la matrice (Sen et Khilar, 2006). Le transport dissout dépend des mécanismes hydrodynamiques de convection et dispersion du polluant, alors que le transport colloïdal, lui est contrôlé d'une part par la mobilité colloïdale elle-même et par les propriétés d'interactions (adsorption/accumulation) du polluant sur ces colloïdes d'autre part. La mobilité des colloïdes dépend d'un grand nombre de paramètres tels que la taille et la concentration en colloïdes, la composition du colloïde, sa charge de surface, le pH et la force ionique de la solution du sol, ou la vitesse d'écoulement de l'eau. Enfin, la rétention des polluants dépend de plusieurs mécanismes physico-chimiques qui sont identiques aux mécanismes passifs identifiés précédemment : il s'agit des phénomènes d'adsorption, de précipitation et de complexation (Mills *et al.*, 1991; Sigg *et al.*, 2000; Sen and Khilar, 2006). Le rôle de ces différents mécanismes dans la mobilité des bactéries et dans leur aptitude à mobiliser des polluants est toutefois encore très peu documenté notamment avec des cellules actives, en mélange ou en présence de mixtures de polluants.

Pour mettre en évidence le rôle des biocolloïdes bactériens dans la mobilisation des métaux lourds, il faut donc considérer d'une part les mécanismes de fixation des métaux sur les cellules bactériennes, et d'autre part les mécanismes de mobilisation de ces cellules elles-mêmes. Dans ce contexte, nous avons évalué, dans ce chapitre, la capacité de nos deux bactéries modèles à faciliter le transport du Zn et du Cd, seuls ou en mélange. Pour cela, nous avons étudié dans un premier temps le transport du Cd et du Zn, seuls ou en mélange, à trois concentrations différentes afin d'évaluer la mobilité de ses métaux dans le milieu poreux modèle, le sable d'Hostun. Puis nous avons étudié l'effet de la présence des bactéries sur le transport de ces métaux. Enfin nous avons tenté d'intégrer les différents résultats de ce travail, obtenus à différentes échelles, par un essai de modélisation du transport colloïdal des métaux modèles avec une approche couplée Transport/Géochimie, faisant appel au logiciel PhreeqC.

## **V-2. Matériel et méthodes**

### **V-2-1. Le dispositif expérimental de transfert**

Les expériences de transfert ont été réalisées de façon à mettre en évidence les conditions pour lesquelles le transport des polluants métalliques est favorisé par les colloïdes bactériens, mais aussi le rôle des colloïdes bactériens dans la biolixiviation de métaux lourds de sols contaminés. Le protocole de préparation des colonnes et le déroulement des expériences sont identiques à ceux présentés dans le Chapitre précédent (§ IV-2-4).

### **V-2-2. Méthodologie d'étude du transport du Zn et du Cd en colonnes de sable d'Hostun**

Des expériences de transfert de zinc et de cadmium seuls ou en mélange ont été réalisées avec le sable d'Hostun. Les concentrations en cadmium et en zinc choisies sont de  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  et  $5.10^{-4}$  M. Le pH des solutions d'injection a été mesuré à  $6,0 \pm 0,2$ . L'équivalent d'un volume de pore (environ 30mL) de ces solutions a été injecté dans la colonne saturée. Cette injection est suivie de l'injection de 6 à 7 volumes de pores d'eau distillée simulant une forte pluie en régime d'écoulement permanent

### **V-2-3. Méthodologie d'étude du transport facilité du Zn et du Cd par les bactéries en colonne de sable d'Hostun**

Des expériences de transfert des métaux et des colloïdes bactériens ont été effectuées avec des concentrations variables de métal et à concentration constante de cellules bactériennes. Les concentrations cellulaires ont été choisies pour garantir une mobilité maximale des colloïdes bactériens au vu du chapitre précédent, mais aussi pour disposer d'une concentration en sites de surface qui soit relativement proche pour les deux souches bactériennes. Ainsi, les concentrations cellulaires injectées sont d'environ  $5.10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  pour *C. metallidurans* CH34 (soit environ  $4.10^{-4}$  moles de sites réactifs  $\text{L}^{-1}$ ) et d'environ  $1.10^9$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  pour *E. coli* K12DH5 $\alpha$  (soit  $6.10^{-4}$  moles de sites réactifs  $\text{L}^{-1}$ ). Deux concentrations métalliques différentes et assez élevées ont été retenues:  $10^{-4}$  et  $5.10^{-4}$ M. Pour ces expériences, un créneau de solution métallique, équivalent à environ un volume de pore (30 mL), est injecté dans la colonne préalablement saturée en eau. Après l'injection des métaux et le lessivage de la colonne par environ 7 volume de pores d'eau distillée, un créneau de cellules bactériennes est injecté afin d'évaluer la capacité des cellules à remobiliser les métaux préalablement fixés à la matrice. Cette injection est suivie de l'injection d'environ 3 volumes de pore d'eau distillée pour éluer le créneau de cellules injectées. Les effluents sont analysés pour suivre l'évolution des concentrations cellulaires et métalliques ainsi que le pH.

### **V-2-4. Profils verticaux de concentration des métaux retenus dans les colonnes de sable d'Hostun.**

En fin d'expérience de transfert des métaux ( $V/V_0 = 10$ ), nous avons caractérisé la distribution verticale des métaux retenus dans le sable d'Hostun. Pour cela, le sable est extrait de la colonne puis découpé en sections de taille variant entre 1.5 et 3 cm (Figure V-1). Les métaux présents dans chaque fraction de sable sont extraits par deux lavages successifs à l'acide nitrique 1 M, puis analysés en ICP-OES (l'ICP-OES Varian 720ES-OES).





**Figure V-1:** Photographies montrant l'extraction et la découpe de colonnes de sable d'Hostun humide après les expériences transport de métaux ou de bactéries. Chaque tranche est ensuite récupérée intégralement et conservée en flacon à 4°C avant analyse.

### **V-3. Modélisation du transfert des métaux en colonnes de sable d'Hostun**

#### **V-3-1. Modélisation couplée transport hydrodynamique / géochimie des métaux**

La modélisation du transport des métaux par les colloïdes bactériens a été conduite avec le logiciel PHREEQC for Windows - version 2.12.5 (Wolery, 1992; Parkhurst and Appelo, 1999). Ce logiciel intègre le couplage des fonctions géochimiques et convectives/dispersives du système étudié. En effet, PHREEQC reproduit numériquement l'équation de convection-dispersion (CDE) mono-dimensionnelle, et résout en parallèle la spéciation chimique des espèces définies impliquées ou non dans le transport (complexation/dissociation, précipitation/dissolution, complexation de surface, équilibre d'échange d'ions, etc...). Le modèle CDE prend en compte un écoulement homogène de solutés au sein du volume poral, régulé uniquement par les phénomènes convectifs et dispersifs. Il est basé sur le principe de conservation de la masse, qui traduit l'égalité entre la variation du stock de solutés et la somme des flux entrant et sortant. Il s'agit en fait de résoudre l'équation différentielle (Eq IV-1) pour notre système expérimental qui est trop complexe pour une résolution analytique du problème posé, raison pour laquelle nous nous sommes tournés vers un code de transfert réactif à résolution numérique du problème. La modélisation proposée est basée sur une discrétisation du milieu étudié en cellules de réaction successives dans lesquelles les différents mécanismes de transport et les réactions chimiques sont résolus séparément dans les cellules représentant les étages de la colonne. Conceptuellement, la colonne peut être considérée comme une série de réacteurs empilés. PhreeqC utilise des banques de données thermodynamiques, dans lesquelles le code recherche les réactions et les constantes nécessaires à la résolution du problème posé. En cas de besoin il est possible de redéfinir des constantes, ou de créer des espèces chimiques et même des composantes (un site réactif du sol non défini dans la banque de donnée, par exemple). Ce code est particulièrement bien adapté à la modélisation des expériences réalisées en colonne de laboratoire et le principe de fonctionnement de PHREEQC a été bien décrit par Février

(2001). En pratique, l'espace est discrétisé en cellules de longueur  $\Delta z$ . Le coefficient de dispersivité ( $\alpha$  en m) du milieu poreux est spécifié dans chaque cellule. Après chaque étape de transport, PHREEQC calcule dans chaque cellule un nouvel état d'équilibre chimique en prenant en compte toutes les réactions spécifiées par l'utilisateur, puis enregistre et déplace d'un réacteur à l'autre les concentrations des espèces mobiles au pas de temps défini.

Les paramètres hydrodynamiques du modèle sont : la dispersivité, le coefficient cinétique d'échange par diffusion moléculaire et la teneur en eau mobile (qui intervient dans la vitesse de pore). A ces paramètres hydrodynamiques, il faut rajouter des paramètres chimiques : les espèces chimiques interagissant avec les solutés et solides et leur réactivité par définition d'une constante thermodynamique. Il est également possible de définir des cinétiques de réaction et de transfert (non utilisé ici). La définition du problème de l'étude nécessite donc un recensement préalable des différentes réactions et paramètres chimiques suivants :

- la nature et la surface spécifique des solides mobiles et immobiles intervenant dans la rétention. Sur cette base seront estimées les capacités d'échange de protons et de métaux des substrats réactifs,

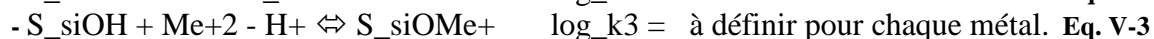
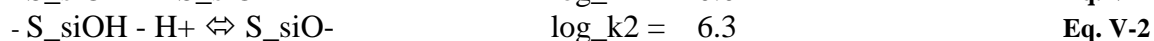
- la spéciation des solutés en phase aqueuse,

Les paramètres géochimiques ainsi déterminés servent alors de base pour la modélisation des interactions. Cette dernière phase passe, d'une part, par l'ajustement des courbes d'élution théoriques calculées par PHREEQC aux courbes d'élution expérimentales obtenues lors des essais de transfert des métaux et, d'autre part, par l'ajustement des profils de concentration théoriques aux profils de concentrations expérimentaux obtenus en fin de lessivage le long des colonnes.

## **V-3-2. Paramétrisation du modèle couplé hydrodynamique/géochimie**

### **V-3-2-1. Modélisation du transport des métaux en colonne de sable d'Hostun**

Pour la modélisation du transport des métaux, on considère, dans un premier temps, qu'il n'y a qu'un seul type de sites au niveau de la matrice sableuse susceptible de fixer les métaux, appelé S-SiOH, et caractérisé par les réactions suivantes :



Avec Me correspondant à un cation métallique (Zn ou Cd dans notre étude).

Ce site représente l'ensemble des sites existants à la surface de la matrice : groupes silanols, groupes fonctionnels carboxyles, amines, phénols de la MO, sites hydroxyles des oxydes Fe/Mn... L'objectif du travail n'est pas de déterminer précisément la nature des sites fixant les métaux sous forme libre dans la colonne, mais plutôt de déterminer les mécanismes de sorption et d'élaborer un modèle de transfert réactif macroscopique. Pour cela la définition d'un seul site complexant nous semble pertinente. Dans l'ensemble des expériences le pH est resté relativement constant avec une faible variation entre 5.9 et 6.2. Ceci signifie que les constantes métalliques ( $\log_{k3}$ ) produisent une spéciation unique des métaux pour notre

valeur de pH. La capacité d'échange protonique totale des sites (concentration totale) et les constantes de complexation sont à ajuster par calage de la courbe modèle sur les données expérimentales. Pour chaque métal, une concentration totale de sites ( $T_{SiOH}$ ) ainsi que les constantes de réaction entre ces sites et les métaux ( $\log_k_3$ ) doivent ainsi être ajustées. Pour cela, on suit l'évolution de la masse de métal éluée ( $M_{\text{éluee}}$ ) des colonnes de sable d'Hostun, normalisée par la masse totale introduit ( $M_{\text{tot}}$ ) de métal dans la colonne en fonction du volume écoulé ( $V/V_0$ ) (Figure V-2).

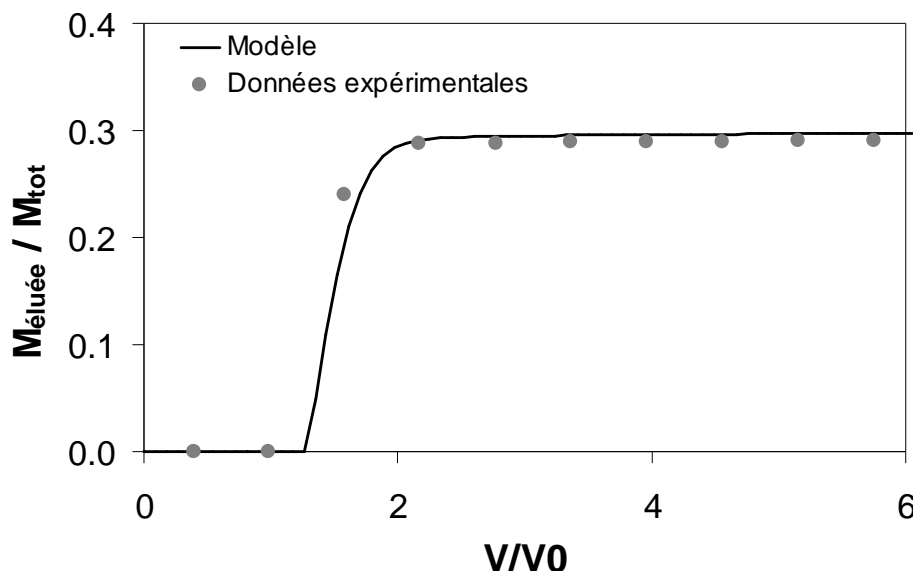


Figure V-2: Exemple d'évolution de la masse normalisée ( $M_{\text{éluee}} / M_{\text{tot}}$ ) du métal éluée en fonction de  $V/V_0$  en condition de saturation des sites de rétention.

L'étude de ces courbes permet d'évaluer la capacité d'échange de la matrice pour le métal étudié. En effet, dans le cas où on aurait atteint la saturation des sites de rétention, la concentration totale de sites et la constante de réaction entre le métal et les sites de rétention sont alors conditionnées par la hauteur du plateau et par le front montant de la courbe. Ces 2 paramètres peuvent ainsi être déterminés avec une grande précision à partir des données expérimentales.

### V-3-2-2. Modélisation du transport des bactéries en colonne de sable d'Hostun

La modélisation du transfert réactif en présence des bactéries nécessite au minimum l'introduction de deux processus de sorption supplémentaires. Premièrement les métaux pourront désormais se fixer soit sur les sites immobiles, soit sur les sites des parois bactériennes (ou du cytoplasme). Deuxièmement, les bactéries peuvent elles-mêmes être immobilisées, et ce avec leur charge de métaux et protons. Ce deuxième processus rencontre un problème de limitation du code Phreeqc qui ne peut pas définir des solides mobiles. Pour modéliser le transport de bactéries dans PhreeqC, les bactéries sont ainsi considérées comme un ensemble de ligands modèles dissous. Nous avons donc défini un site bactérien unique nommé  $C_c$  ( $T_{C_c}$  sa concentration totale) représentant ce ligand bactérien et échangeant des protons et des métaux avec la solution, et pouvant se fixer sur la phase immobile. Ce groupe fonctionnel bactérien représente en fait une fraction réactive d'une bactérie. La rétention des bactéries sur la phase immobile requiert la définition d'un autre site acceptant les ligands

bactériens sur la matrice. On introduit donc un site ( $S_b$ ), et une concentration totale correspondante  $T_{Sb}$  retenant  $C_c$  par complexation. Ceci revient donc à modéliser la rétention des bactéries par un processus thermodynamique de sorption. Il va de soit que ce modèle est très simplifié en vue des processus complexes impliqués dans la rétention des bactéries comme cela a été montré au Chapitre IV. La constante de sorption de ce site ainsi que sa concentration totale sont donc sans fondement physique et seront nécessairement déterminé par calage aux données expérimentales. Par ailleurs, la réaction d'immobilisation du site bactérien ne doit pas modifier le cadmium et le zinc et les protons associés au ligand (dans la mesure où l'on considère que la sorption de la bactérie n'affecte pas son chargement en protons et en métal).

Dans la modélisation, retenue pour calculer le transport des cellules bactériennes, nous ne considérons donc qu'un seul groupe fonctionnel ( $C_c$ ) qui contrôle la rétention des ligands bactériens sur la matrice du sol. Comme pour les métaux, il est nécessaire d'ajuster la concentration de sites de rétention ainsi que les constantes de réactions entre la matrice et les ligands bactériens. Pour cela, nous ajustons notre modèle sur les données expérimentales en nous intéressant à l'évolution de la masse des ligands bactériens éluée ( $M_{\text{éluee}}$ ) normalisée par la quantité totale de ligands bactériens introduite ( $M_{\text{tot}}$ ) en fonction de  $V/V_0$  pour les deux bactéries modèles, à partir des expériences de transport des cellules bactériennes dans le sable d'Hostun obtenues dans le Chapitre précédent (Figure IV-16 et Tableau IV-2).

## **V-4. Résultats**

Afin d'étudier l'effet des bactéries sur le transfert de Cd et Zn, nous avons d'abord caractérisé les courbes d'élution des deux métaux seuls, afin de déterminer les mécanismes d'interactions du Cd et du Zn avec le milieu poreux. Ensuite nous avons caractérisé la distribution des métaux retenus dans la matrice pendant l'expérience de transfert aux trois concentrations métalliques testées:  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  et  $5 \cdot 10^{-4}M$ .

### **V-4-1. Etude et modélisation du transport du cadmium et du zinc en colonne de sable d'Hostun**

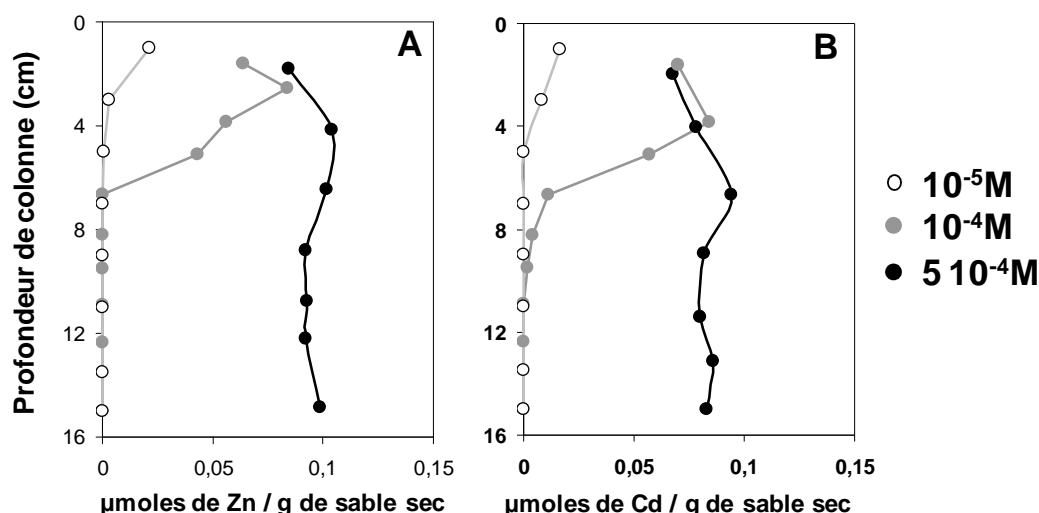
#### **V-4-1-1. Cas des métaux seuls**

Le Tableau V-1 présente les conditions expérimentales utilisées dans les essais de transfert du zinc et du cadmium en colonnes de sable d'Hostun aux trois concentrations d'étude (Une colonne préparée pour chaque essai).

**Tableau V-1: Conditions expérimentales et paramètres des essais de transfert du zinc ou du cadmium et des profils de concentrations du zinc ou du cadmium dans les colonnes de sable d'Hostun.**

	Cadmium			Zinc		
Concentration métallique (mol L <sup>-1</sup> )	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	5 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	5 10 <sup>-4</sup>
Volume pore (mL)	34	33.3	34.3	33.8	33.6	34.2
Dispersivité (cm)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Masse de métal injectée (µg)	33	366	2243	18.2	168	1315
Volume de solution métallique injectée (mL)	33.3	30.3	32.6	29.7	29.5	34.3
TR <sup>*</sup> de métal dans les effluents (%)	0	0	27.2	0	0	23.4
TR <sup>*</sup> de métal retenu dans le sable (%)	98.2	91.2	65.2	81.9	94.7	66.4
Bilan de masse métal (%)	98.2	91.2	92.4	81.9	94.7	89.7

Les profils de concentration du Cd et du Zn retenus dans les colonnes de sable d'Hostun après lessivage des colonnes avec 8 volumes de pores d'eau sont présentés dans la Figure V-3. On observe une évolution des profils de concentration avec l'augmentation de la concentration d'injection (Figure V-3). Aux deux plus faibles concentrations, les deux métaux sont retenus dans les premiers centimètres de la colonne ce qui a justifié de réaliser des essais de transfert à une concentration plus élevée (5 10<sup>-4</sup>M). Ceci a permis de saturer totalement les sites de rétention et de permettre l'élution des métaux, et ainsi d'ajuster les paramètres de modélisation, comme expliqué précédemment. Les résultats montrent que plus la concentration métallique est élevée plus les métaux sont transportés profondément dans le sable. Les résultats montrent clairement qu'en augmentant la concentration en métaux, on arrive à saturer le sable jusqu'à obtenir un profil de concentration vertical constant et égal à environ 0.1 µmoles de métal retenu par gramme de sable sec indiquant une répartition homogène des sites de rétention au niveau de la matrice sableuse.



**Figure V-3 : Profils de concentration solide du Zn (A) et du Cd (B) en colonnes de sable d'Hostun, après injection de solution de métaux à 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup> et 5 10<sup>-4</sup> M. Les profils ont été mesurés après écoulement de 8 volumes de pores d'eau déminéralisée.**

\* TR= taux de récupération

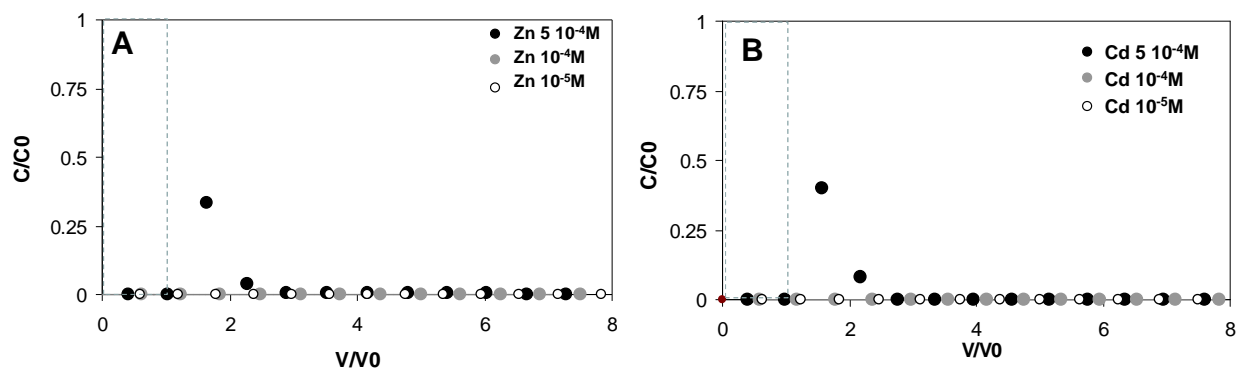


Figure V-4 : Courbes d'élution mesurées du Zn (A) et du Cd (B), injectés à  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  et  $5 \cdot 10^{-4}$  M, en colonnes de sable d'Hostun.

La Figure V-4 montre qu'aux deux concentrations les plus faibles ( $10^{-5}$  et  $10^{-4}M$ ), aucune trace de cadmium ou de zinc n'a pu être détectée en sortie de colonne après le passage de 8 volumes de pores d'eau. Ces résultats confirment une rétention totale des deux métaux introduits. Ce n'est qu'à partir d'une concentration d'injection de  $5 \cdot 10^{-4}M$  que l'on observe l'élution des deux métaux, environ 27% du Cd et 23% du Zn injectés, indiquant ainsi la saturation des sites de rétention des métaux dans les colonnes, en accord avec les profils de concentration du Cd et du Zn observés dans la Figure V-3. Les taux de récupération en sortie de colonne ainsi calculés sont présentés dans le Tableau V-1. On remarque que les courbes d'élution et les profils de rétention de Cd et de Zn sont très proches même si le Zn semble plus fortement retenu que le Cd. Ces résultats indiquent que la rétention du Zn et du Cd peut être modélisée avec des constantes de sorption et des densités de sites très proches pour les deux métaux. A la plus forte concentration, le nombre de sites de rétention présents sur la matrice n'est pas suffisant pour retenir la totalité du Cd ou du Zn injectés ce qui induit leur élution partielle. Les profils verticaux de rétention mesurés en fin d'expérience montrent une répartition homogène des deux métaux modèles dans la colonne. Ceci indique une répartition homogène des sites de rétention le long de la colonne (environ  $0.1 \mu\text{moles/g}$  sable sec) montrant ainsi que le sable d'Hostun présente une réactivité assez importante vis-à-vis du Cd et du Zn, et en tout cas bien plus importante que le sable de Fontainebleau (Guiné et al., 2003). Dans les conditions expérimentales testées (pH 6 et force ionique faible), les deux métaux retenus sont fixés à la matrice de manière irréversible et on observe un lessivage que lorsque la totalité des sites de rétention est occupée. Le passage de plusieurs volumes de pores d'eau distillée ne permet pas de remobiliser le Cd et le Zn retenus de manière irréversible dans le sable.

#### V-4-1-2. Cas des métaux en mélange

Des expériences de transfert ont été réalisées dans les mêmes conditions avec un mélange des deux métaux modèles pour évaluer les effets potentiels de compétition ou de synergie entre le zinc et le cadmium sur leur transport. Les conditions expérimentales de transport du Cd et du Zn en mélange en colonne de sable d'Hostun sont présentées dans le Tableau V-2.

**Tableau V-2 : Conditions expérimentales et paramètres des essais de transfert du zinc et du cadmium en mélange et des profils de concentrations du zinc ou du cadmium en mélange dans les colonnes de sable d'Hostun.**

	Cadmium en mélange		Zinc en mélange	
Concentration métallique (mol L <sup>-1</sup> )	10 <sup>-4</sup>	5 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	5 10 <sup>-4</sup>
Volume pore (mL)	32.6	33.6	32.6	33.6
Dispersivité (cm)	0.04	0.04	0.04	0.04
Masse de métal injectée (µg)	291	2049	178	1203
Volume de solution métallique injectée (mL)	30.2	40.5	30.2	40.5
TR* de métal dans les effluents (%)	0	59.2	0	58.4
TR* de métal retenu dans le sable (%)	98.2	24.1	99.1	25.8
Bilan de masse métal (%)	98.2	83.2	99.1	84.2

Les courbes de percée du Cd et du Zn en mélange aux deux concentrations d'étude (10<sup>-4</sup> et 5 10<sup>-4</sup>M), ainsi que les profils de rétention dans les colonnes de sable d'Hostun sont présentés dans la Figure V-5. Compte tenu de la forte rétention des métaux observée précédemment, nous avons choisi de réaliser les expériences de transfert de métaux en mélange, avec ou sans bactéries, seulement aux deux plus fortes concentrations. Les courbes de percée du Zn et du Cd en mélange ainsi que les profils de rétention, ont une forme similaire pour les deux métaux, indiquant que les mécanismes de transport et les interactions avec la matrice sont similaires. L'injection des deux métaux en mélange augmente et accélère leur transport par rapport aux cas mono-métalliques décrits précédemment. Ce résultat s'explique par la plus rapide saturation des sites de rétention des métaux qui semblent être les mêmes pour les deux métaux, contribuant ainsi à augmenter leur concentration en solution et donc leur mobilité. Pour cette raison, même à la plus faible concentration, les deux métaux saturent le sable beaucoup plus profondément dans la colonne lorsqu'ils sont injectés en mélange. Les taux de récupérations des deux métaux en sortie de colonne sont ainsi doublés lorsque les deux métaux sont injectés en mélange, confirmant ainsi la rapide saturation des sites de rétention en métaux et la compétition pour les sites de sorption. Les bilans de masse calculés en conditions de mélange sont de 59.2% et de 58.4% pour le Cd et le Zn, respectivement. Ils étaient de 27% et de 23% pour le Cd et le Zn injectés seuls dans le sable. On note qu'en conditions de mélange, les concentrations de Cd et de Zn retenues dans la colonne sont d'environ 0.5 µmoles par gramme de sable sec, soit la moitié de celles mesurées avec les métaux seuls. Ceci est en accord avec un processus de compétition de ceux deux métaux pour les sites de rétention au niveau de la matrice et indique que le Zn et le Cd sont bien retenus sur les mêmes sites réactifs au niveau de la matrice.

\* TR= taux de récupération

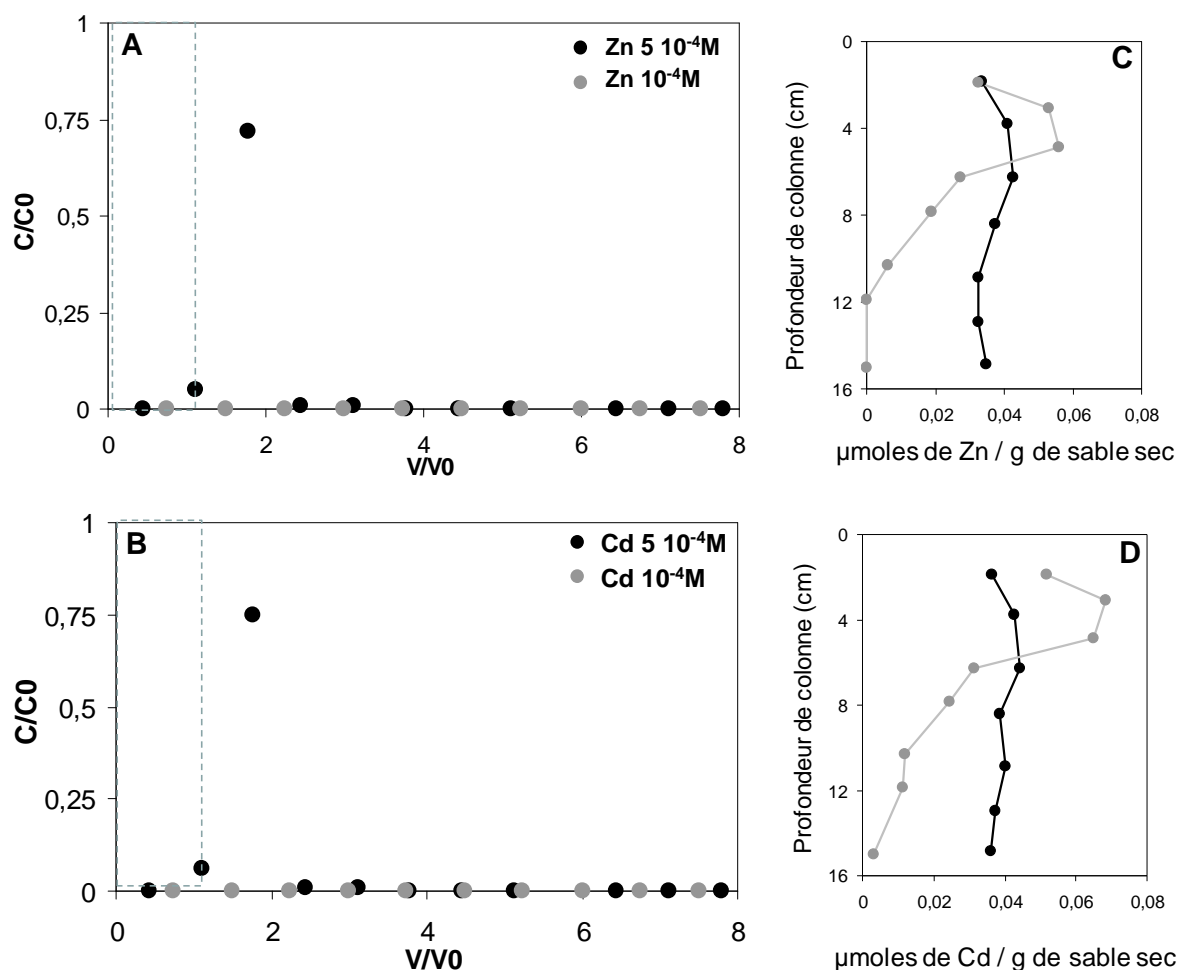


Figure V-5 : Courbes d'élution du Zn (A) et du Cd (B) et profils de rétention du Zn (C) du Cd (D) en colonnes de sable d'Hostun, injectés en conditions de mélange à  $10^{-4}$  (symbole gris) et  $5 \times 10^{-4}$  M (symbole noir), mesurés après écoulement de 8 volumes de pores d'eau distillée.

#### V-4-1-3. Modélisation du transport du Cd et du Zn seuls ou en mélange en colonnes de sable d'Hostun

Les résultats expérimentaux obtenus montrent que pour la plus forte concentration métallique d'injection ( $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) on atteint une saturation des sites de rétention pour les deux métaux menant à l'élution d'une partie des métaux non retenus par la matrice faute de sites de rétention libres. Comme expliqué dans le paragraphe V-3, on peut alors ajuster les paramètres du modèle à partir des données expérimentales en comparant l'évolution de la masse de métal éluée, normalisée par la masse totale injectée, en fonction de  $V/V_0$  (Figure V-6). Cela nous permet de quantifier la concentration de sites ( $T_{\text{SiOH}}$ ) ainsi que les constantes de complexation entre ces sites et le Cd et le Zn (pK3).



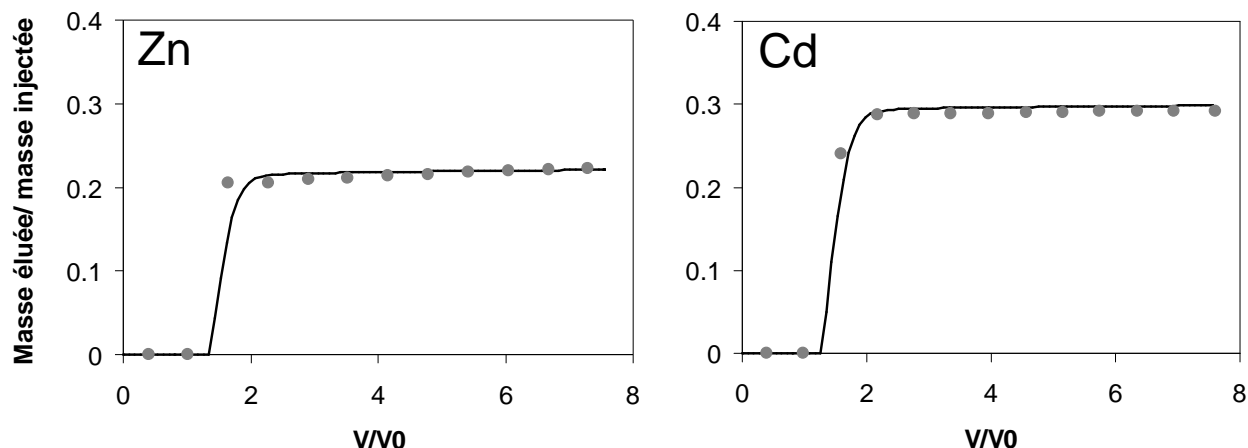


Figure V-6: Evolution de la masse de cadmium et de zinc ( $5 \cdot 10^{-4}$ M) éluée des colonnes de sable d'Hostun en fonction de  $V/V_0$  normalisée par la masse injectée.

Pour le cadmium et le zinc, les paramètres présentés dans le Tableau V-3 ont été obtenus par calage du modèle avec les données expérimentales du transport du Cd et du Zn à  $5 \cdot 10^{-4}$ M. A partir de ces paramètres, nous avons modélisé le transport du Cd et du Zn (courbe d'élution et profils de concentration verticaux) pour les trois concentrations d'étude. Les courbes de percée ainsi que les profils de concentration modélisés sont présentés dans la Figure V-6.

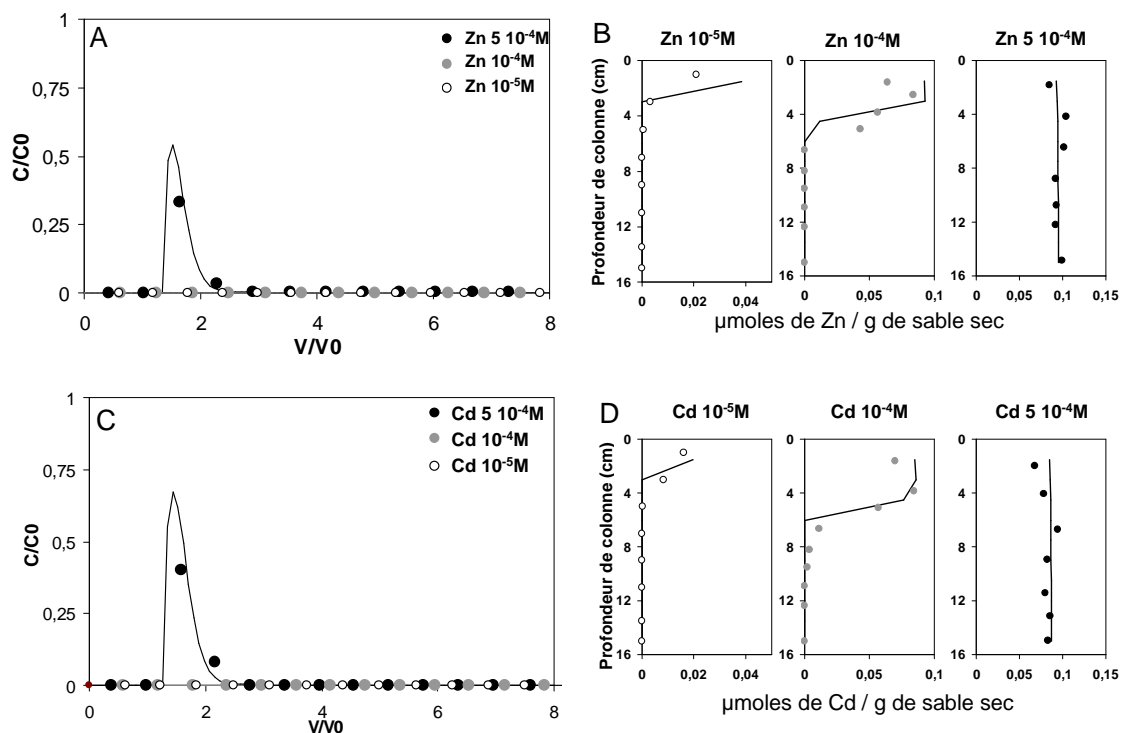
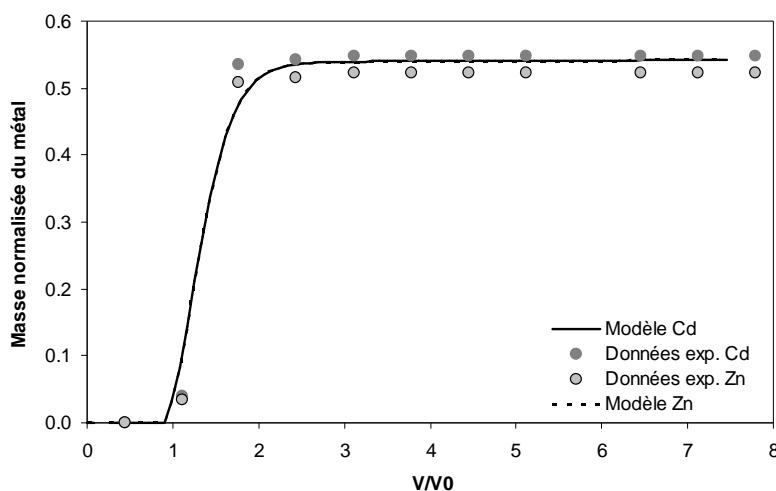


Figure V-7 : Courbes d'élution du Zn (A) et du Cd (C), injectés à  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  et  $5 \cdot 10^{-4}$  M, et profils de concentration verticaux du Zn (B) et du Cd (D) en colonnes de sable d'Hostun, mesurés après écoulement de 8 volumes de pores d'eau distillée. Les symboles correspondent aux points expérimentaux, les lignes correspondent aux courbes calculées avec PhreeqC en utilisant les paramètres présentés dans le Tableau V-3.

On note que le modèle reproduit de manière satisfaisante les données et permet ainsi de reproduire correctement les courbes d'élution ainsi que les profils de concentrations du zinc et du cadmium retenus dans la colonne de sable d'Hostun pour les trois concentrations d'étude. Le modèle simule correctement l'absence d'élution de Cd et de Zn aux deux plus faibles concentrations. Pour la plus forte concentration, les bilans de masse de Cd et de Zn élués calculés sont proches de ceux mesurés expérimentalement pour les deux métaux, validant ainsi notre jeu de paramètres. Les courbes de percée et les profils de rétention du Zn et du Cd sont très proches confirmant que le transport de ces deux métaux dans le sable d'Hostun peuvent être modélisés avec des constantes de sorption et des densités de sites très proches pour les deux métaux. Les valeurs de  $T_{\text{SiOH-Zn}}$  et de  $T_{\text{SiOH-Cd}}$  sont proches, confirmant que les sites où se fixent le Zn et le Cd sont vraisemblablement les mêmes.

Concernant la modélisation du transport du Cd et du Zn en mélange, nous avons ajusté les courbes expérimentales à partir des concentrations totales de sites de rétention du Cd. Nous n'avons introduit qu'un seul type de site de rétention sur la matrice. La Figure V-8 présente l'évolution des masses de Cd et de Zn éluées, normalisées par les masses totales injectées, en fonction de  $V/V_0$  mesurées et calculées. Ces résultats montrent que les paramètres ajustés sur les essais réalisés avec les métaux seuls permettent de reproduire le transport du Cd et du Zn en mélange.



**Figure V-8: Evolution de la masse normalisée par la msse injectée de cadmium et du zinc en conditions de mélange ( $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ ) éluee des colonnes de sable d'Hostun en fonction de  $V/V_0$ .**

A partir de ces paramètres, nous avons donc modélisé le transport (courbe d'élution et profils de rétention) du Cd et du Zn en mélange pour les deux concentrations d'étude (Figure V-9). Les résultats satisfaisants obtenus en ne décrivant qu'un seul type de sites de rétention au niveau de matrice confirment que les deux métaux entrent bien en compétition pour les mêmes sites de rétention. Toutefois, la forme des courbes de percée ainsi que les profils de rétention modélisés ne correspondent pas tout à fait aux courbes expérimentales, indiquant sans doute l'existence d'autres types d'interactions entre les deux métaux et la matrice non prises en compte par notre modélisation, assez simpliste.

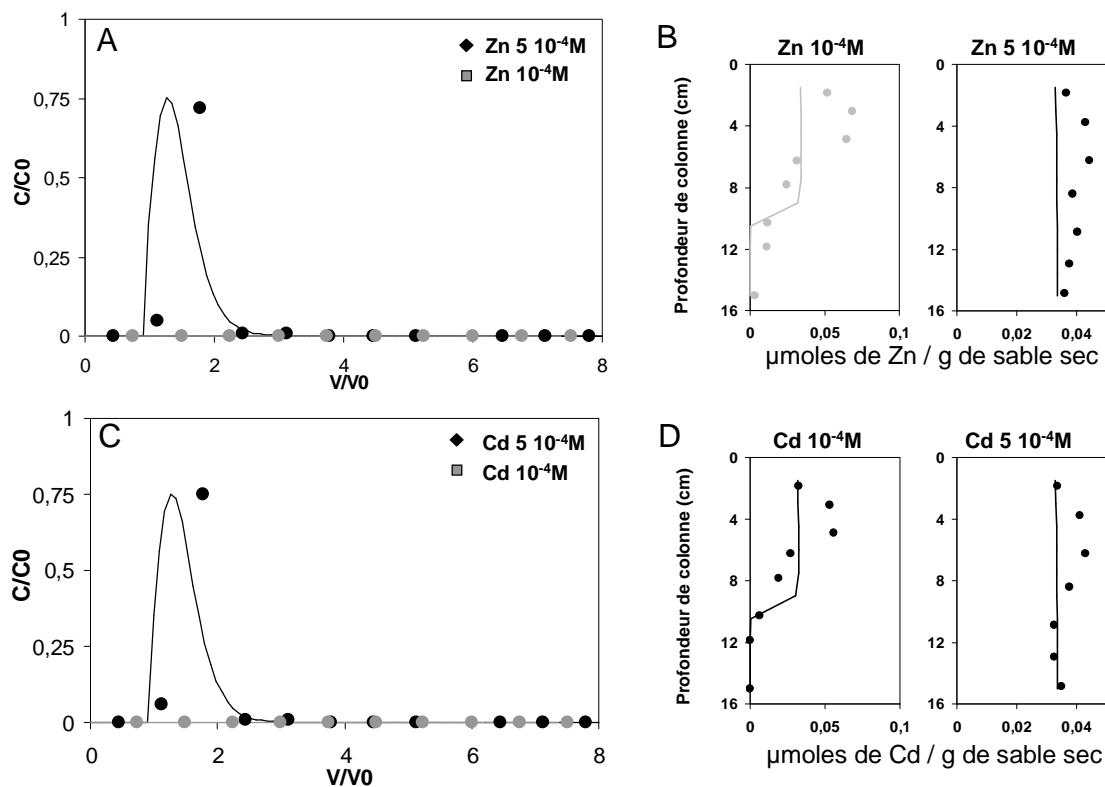


Figure V-9 : Courbes d'élution du Zn (A) et du Cd (C), injectés en mélange à  $10^{-4}$  et  $5 \cdot 10^{-4}$  M, et profils de concentration verticaux du Zn (B) et du Cd (D) en colonnes de sable d'Hostun, mesurés après écoulement de 8 volumes de pores d'eau distillée. Les symboles correspondent aux points expérimentaux, les lignes correspondent aux courbes calculées avec PhreeqC en utilisant les paramètres présentés dans le Tableau V-3.

Le Tableau V-3 résume les paramètres de modélisation ajustés pour décrire le transport réactif du Zn et du Cd, seuls ou en mélange, en colonnes de sable d'Hostun. Ces paramètres seront utilisés par la suite, pour la modélisation des essais de transport des deux métaux en présence de bactéries sans autre ajustement.

Tableau V-3 : Paramètres de modélisation calés avec l'ajustement des courbes de percée du zinc ou du cadmium, seul ou en mélange, et des profils de rétention du zinc ou du cadmium dans les colonnes de sable d'Hostun.

	Cadmium	Zinc	Cadmium en mélange	Zinc en mélange
Dispersivité (cm)	0.04	0.04	0.04	0.04
[TSiOH] moles de sites $L^{-1}$	$350 \cdot 10^{-6}$	$380 \cdot 10^{-6}$	$350 \cdot 10^{-6}$	$350 \cdot 10^{-6}$
Log_k3 (Eq. V-3)	15	15	15	15

## V-5. Effet de la présence de bactéries sur le transport du cadmium et du zinc en colonne de sable d'Hostun

### V-5-1. Effet de *Cupriavidus metallidurans* CH34

#### V-5-1-1. Cas des pollutions mono-métalliques de Zn et de Cd

Le Tableau V-4 présente les conditions expérimentales utilisées dans les essais de transfert du zinc et du cadmium en présence de cellules de *C. metallidurans* CH34. Les tests préliminaires à la plus faible concentration ( $10^{-5}$ M) ne s'étant pas avérés intéressants en raison d'une trop forte rétention des métaux dans la colonne, nous avons choisi de réaliser les expériences de transfert de métaux en présence de bactéries seulement aux deux plus forte concentrations métalliques, soit  $10^{-4}$  et  $5.10^{-4}$ M. On note que lors de ces essais les taux de récupération de métaux mesurés pour les deux métaux sont satisfaisants et toujours supérieurs à 90%.

**Tableau V-4 : Conditions expérimentales des essais de transfert du Zn ou du Cd réalisés en présence de cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 ( $4 \cdot 10^8$  UFC/mL) et des profils de concentrations des métaux dans les colonnes de sable d'Hostun.**

Métal	Cadmium		Zinc	
Volume de pore (mL)	34.7	34.6	33.7	33.4
Volume injecté (mL)	32.7	30.2	29.3	29.0
Quantité de métal injectée (en µg)	383	1789	208	981
Concentration de métal injectée (mol/L)	$1.0 \cdot 10^{-4}$	$5.3 \cdot 10^{-4}$	$1.1 \cdot 10^{-4}$	$5.2 \cdot 10^{-4}$
Concentration initiale de bactéries (UFC/mL)	$4.4 \cdot 10^8$	$4.0 \cdot 10^8$	$6.6 \cdot 10^8$	$4.0 \cdot 10^8$
Concentration initiale de sites sur les bactéries (moles de sites de surface/L)	$2.4 \cdot 10^{-4}$	$2.0 \cdot 10^{-4}$	$4.6 \cdot 10^{-4}$	$2.0 \cdot 10^{-4}$
TR* de bactéries (%)	68.7	63.9	70.1	63.2
TR* de métal dans les effluents avant injection de bactérie (%)	0.0	21.1	0.0	6.7
TR* de métal dans les effluents après injection de bactérie (%)	0.5	24.5	1.3	10.8
TR* de métal retenu dans le sable en fin d'essai de transfert (%)	92.5	65.6	96.6	79.3
Bilan de masse métal (%)	93.0	90.1	98.0	91.1

Les Figures V-10 et V-11 présentent les profils verticaux de concentration de Cd et de Zn, aux deux concentrations d'étude, ainsi que les courbes d'élution des deux métaux mesurés lors des expériences de transport en présence de *C. metallidurans* CH34.

\* TR = Taux de récupération

Les profils de concentration des deux métaux, présentés sur les Figures V-10 et V-11, montrent que, pour les deux concentrations métalliques, l'injection de cellules de *C. metallidurans* CH34 dans le sable contaminé modifie la distribution du Cd et du Zn retenus dans la colonne de sable. En effet on observe une mobilisation des métaux retenus dans les premiers centimètres que l'on retrouve dans le bas de la colonne après le passage des bactéries. De plus on observe, à la plus forte concentration, que la quantité de sites de rétention métallique augmente dans les derniers centimètres de la colonne ( $> 0.1$   $\mu\text{moles}$  de métal retenu par gramme de sable sec) indiquant qu'une part des métaux doit être retenues sur les cellules elles même retenues dans la colonne, expliquant l'augmentation de la capacité de rétention. Une mesure des profils de concentrations des cellules bactériennes (que nous n'avons pu réaliser faute de temps) pourrait confirmer cet effet. Ces résultats montrent que la présence de *C. metallidurans* CH34 induit un effet sur la mobilité du cadmium et du zinc retenus de manière irréversible dans le sable. En revanche les courbes d'élution montrent que l'injection d'un créneau de cellules de *C. metallidurans* CH34 ne permet pas de mobiliser suffisamment les métaux pour observer leur élution. On note tout de même qu'à la plus forte concentration l'injection de cellules de *C. metallidurans* CH34 induit une légère élution du Cd (0.5% du cadmium initialement injecté) et du Zn (1.3% du zinc initialement injecté). Ces résultats confirment que la présence de *C. metallidurans* CH34 modifie la mobilité de ces deux métaux dans les colonnes de sable d'Hostun confirmant les résultats des profils verticaux de concentration. Les bilans de masse des cellules de *C. metallidurans* CH34 mesurés en sortie de colonne sont proches de ceux observés lors des expériences de transfert des bactéries seules indiquant que la présence de métaux dans la colonne n'affecte pas le transport des cellules de *C. metallidurans* CH34 (Tableau V-4). Des mesures de pH dans les effluents de colonne montrent que l'injection d'un créneau de cellules de *C. metallidurans* CH34 n'a pas d'effet significatif sur le pH qui reste stable ( $6.2 \pm 0.2$ ).

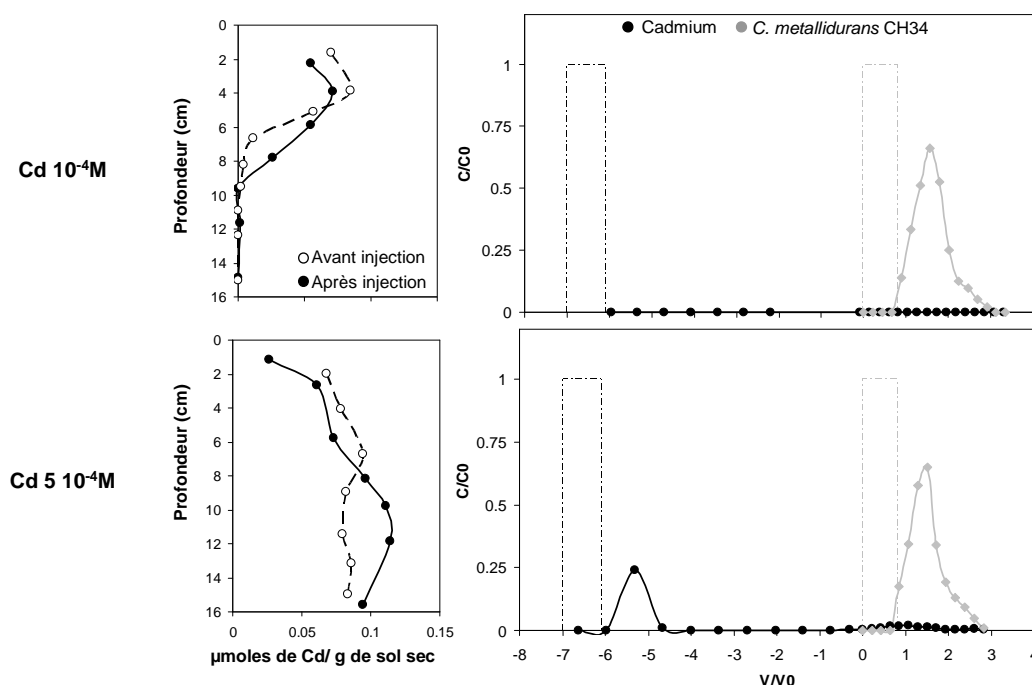


Figure V-10: Profils verticaux de concentration mesurés de Cd, injectés à  $10^{-4}\text{M}$  et  $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , dans les colonnes de sable d'Hostun avant ( $V/V_0 = 0$ ) et après ( $V/V_0 = 4$ ) injection des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 et courbes d'élution du Cd en colonne de sable d'Hostun, injectés à  $10^{-4}\text{M}$  et  $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$  à  $V/V_0 = -7$ , en présence de cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 injectées à  $5 \cdot 10^8$  UFC/mL à  $V/V_0 = 0$ .

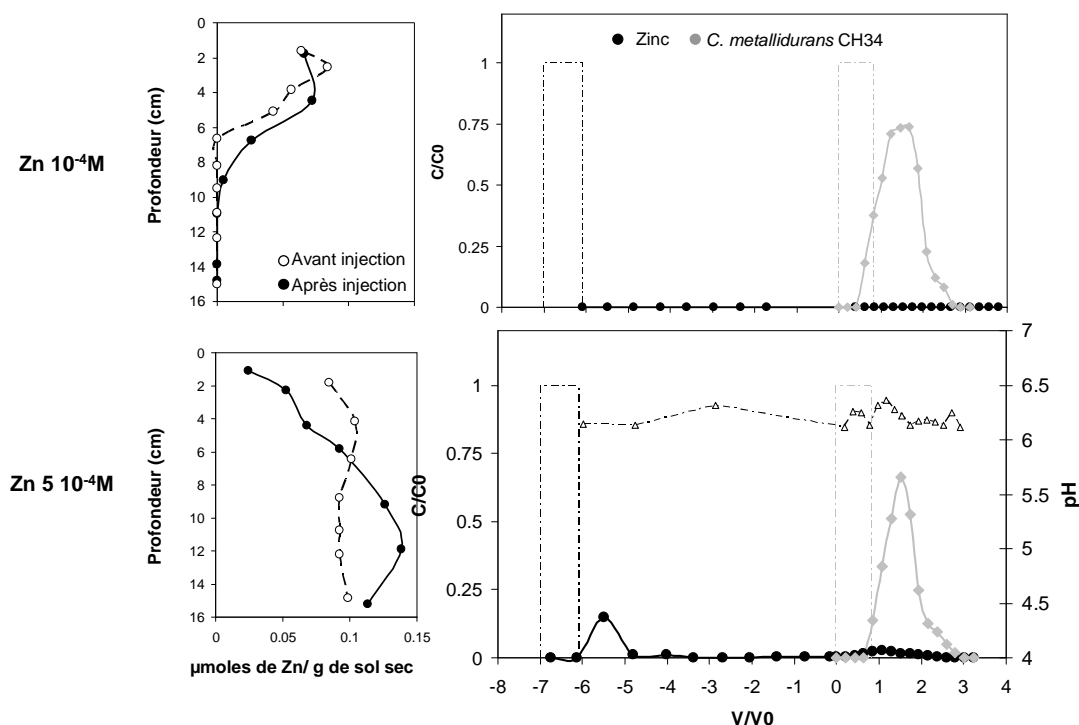


Figure V-11 : Profils verticaux de concentration mesurés de Zn, injectés à  $10^{-4}$  M et  $5 \cdot 10^{-4}$  M, dans les colonnes de sable d'Hostun avant ( $V/V_0 = 0$ ) et après ( $V/V_0 = 4$ ) injection des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 et courbes d'élution du Zn en colonne de sable d'Hostun, injectés à  $10^{-4}$  M et  $5 \cdot 10^{-4}$  M à  $V/V_0 = -7$ , en présence de cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 injectées à  $5 \cdot 10^8$  UFC/mL à  $V/V_0 = 0$

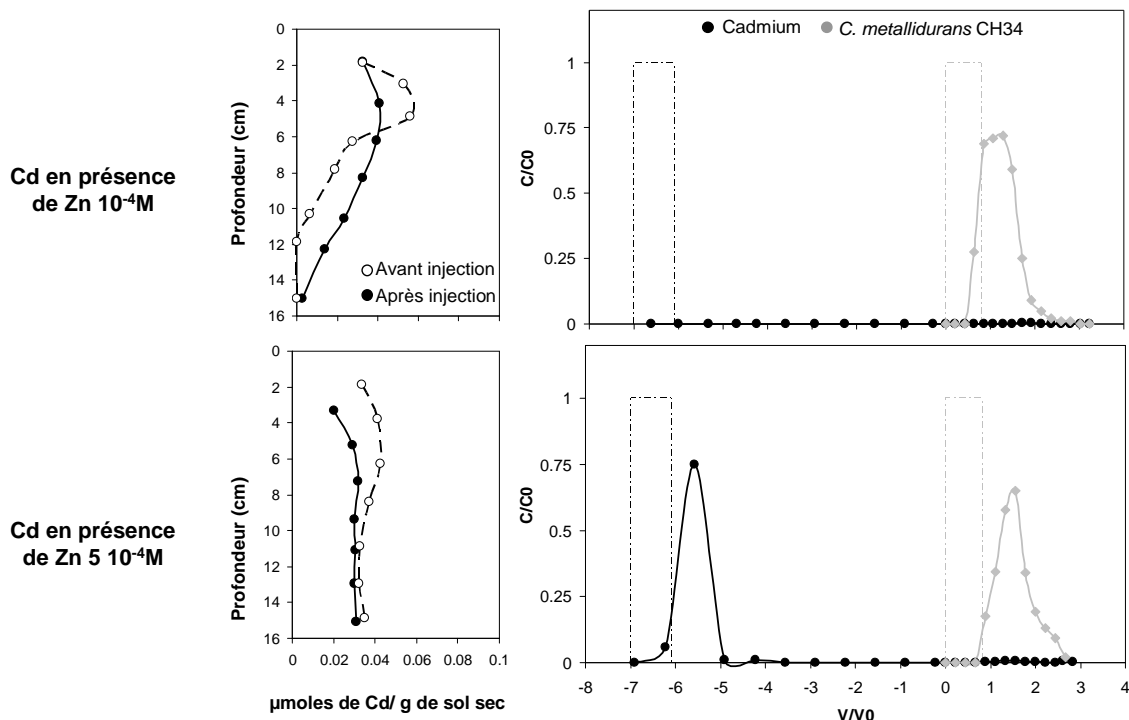
#### V-5-1-2. Cas du cadmium et du zinc en mélange

Le Tableau V-5 présente les principales conditions expérimentales des essais de transport du Cd et du Zn en mélange réalisées en présence de *C. metallidurans* CH34 en colonne de sable d'Hostun. On note que les taux de récupération des métaux sont satisfaisants et toujours supérieur à 89%.

Les Figures V-12 et V-13 présentent les profils verticaux de concentration de Cd et de Zn, aux deux concentrations d'étude, ainsi que les courbes d'élution des deux métaux mesurés lors des expériences de transport de Cd et de Zn en mélange en présence de *C. metallidurans* CH34. Les résultats obtenus montrent une modification importante des profils de concentrations des métaux retenus dans la colonne, indiquant que la présence des cellules de *C. metallidurans* CH34 induit la remobilisation de ces deux métaux, même en mélange. Ceci se traduit par un transfert d'une partie des métaux retenus dans les premiers centimètres vers le bas de la colonne pour les deux concentrations métalliques. Ces résultats confirment l'effet des cellules de *C. metallidurans* CH34 sur la mobilité des deux métaux modèles qui se traduit par un déplacement du Cd et du Zn en profondeur dans les colonnes. De même que lors des expériences réalisées avec les métaux injectés seuls, l'injection de cellules de *C. metallidurans* CH34 induit une remobilisation des métaux le long de la colonne mais insuffisante pour permettre leur élution, même partielle, à la plus faible concentration.

**Tableau V-5: Conditions expérimentales des essais de transfert du Zn et du Cd en mélange réalisés en présence de cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 ( $5 \cdot 10^8$  UFC/mL) et des profils de concentrations des métaux dans les colonnes de sable d'Hostun.**

Métal	Cadmium (Mélange)		Zinc (Mélange)	
Volume de pore (mL)	34.4	33.7	34.4	33.7
Volume injecté (mL)	30.8	30.6	30.8	30.6
Quantité de métal injectée (en $\mu\text{g}$ )	365	1748	254	1027
Concentration de métal injectée (mol/L)	$1.0 \cdot 10^{-4}$	$5.1 \cdot 10^{-4}$	$1.3 \cdot 10^{-4}$	$5.1 \cdot 10^{-4}$
Concentration initiale de bactéries (UFC/mL)	$4.7 \cdot 10^8$	$3.9 \cdot 10^8$	$4.7 \cdot 10^8$	$3.9 \cdot 10^8$
Concentration initiale de sites sur les bactéries (moles de sites de surface/L)	$2.7 \cdot 10^{-4}$	$2.1 \cdot 10^{-4}$	$2.7 \cdot 10^{-4}$	$2.1 \cdot 10^{-4}$
TR* de bactéries (%)	66.1	60.4	66.1	60.4
TR* de métal dans les effluents avant injection de bactérie (%)	0.00	61.3	0.00	60.8
TR* de métal dans les effluents après injection de bactérie (%)	0.4	62.1	0.7	63.5
TR* de métal retenu dans le sable en fin d'essai de transfert (%)	95.4	27.3	95.6	31.3
Bilan de masse métal (%)	95.7	89.4	96.3	94.8

**Figure V-12: Profils verticaux de concentration mesurés de Cd, injectés en mélange à  $10^{-4}\text{M}$  et  $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , dans les colonnes de sable d'Hostun avant ( $V/V_0 = 0$ ) et après ( $V/V_0 = 4$ ) injection des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 et courbes d'élution du Cd en colonne de sable d'Hostun, injectés en mélange à  $10^{-4}\text{M}$  et  $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$  à  $V/V_0 = -7$ , en présence de cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 injectées à  $5 \cdot 10^8$  UFC/mL à  $V/V_0 = 0$ .**

\* TR = Taux de récupération

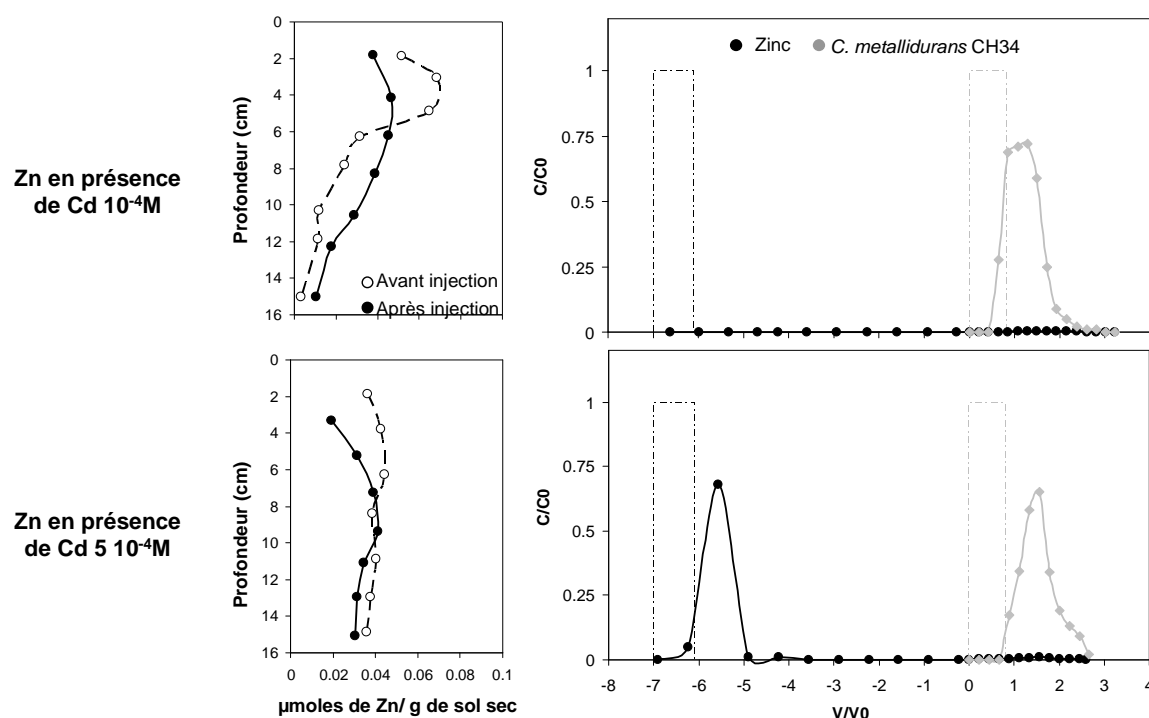


Figure V-13 : Profils verticaux de concentration mesurés de Zn, injectés en mélange à  $10^{-4}\text{M}$  et  $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , dans les colonnes de sable d'Hostun avant ( $V/V_0 = 0$ ) et après ( $V/V_0 = 4$ ) injection des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 et courbes d'élution du Zn en colonne de sable d'Hostun, injectés en mélange à  $10^{-4}\text{M}$  et  $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$  à  $V/V_0 = -7$ , en présence de cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 injectées à  $5 \cdot 10^8$  UFC/mL à  $V/V_0 = 0$ .

A la plus forte concentration, on note une légère élution des deux métaux après l'injection des cellules de *C. metallidurans* CH34. En effet, 1.2% et 2.7 % de la quantité de métal injectée peuvent être mesurés dans les effluents de colonne après l'injection des bactéries pour le Cd et le Zn, respectivement. On note que les quantités de Cd et de Zn sont éluées dans le même timing que les bactéries confirmant l'effet des cellules bactériennes sur la mobilité des deux métaux modèles préalablement retenu de manière irréversible dans les colonnes de sable d'Hostun. Il semble également que la présence des métaux dans le milieu ne modifie pas le transport des cellules de *C. metallidurans* CH34 en accord avec ses capacités de résistance.

## V-5-2. Etude du transport du cadmium et du zinc par *Escherichia coli* K12DH5 $\alpha$

### V-5-2-1. Cas des pollutions mono-métalliques de Zn et de Cd

Le Tableau V-6 présente les conditions expérimentales utilisées dans les essais de transfert du zinc et du cadmium en présence de cellules de *E. coli* K12Dh5 $\alpha$  en colonne de sable d'Hostun. Les taux de récupération des métaux dans ces essais sont satisfaisants et toujours supérieurs à 89%.



**Tableau V-6: Conditions expérimentales des essais de transfert du Zn ou du Cd réalisés en présence de cellules de *Escherichia coli* K12DH5a (5 10<sup>8</sup> UFC/mL) et des profils de concentrations des métaux dans les colonnes de sable d'Hostun.**

Métal	Cadmium		Zinc	
Volume de pore (mL)	35.1	34.5	35.0	33.8
Volume injecté (mL)	30.7	30.4	30.4	33.3
Quantité de métal injectée (en µg)	307	1861	254	1086
Concentration de métal injectée (mol/L)	8.9 10 <sup>-5</sup>	5.4 10 <sup>-4</sup>	1.3 10 <sup>-4</sup>	5.0 10 <sup>-4</sup>
Concentration initiale de bactéries (UFC/mL)	1.0 10 <sup>9</sup>	1.0 10 <sup>9</sup>	9.0 10 <sup>8</sup>	1.1 10 <sup>9</sup>
Concentration initiale de sites sur les bactéries (moles de sites de surface/L)	7.2 10 <sup>-4</sup>	7.6 10 <sup>-4</sup>	6.2 10 <sup>-4</sup>	8.2 10 <sup>-4</sup>
TR* de bactérie (%)	89.1	85.9	87.7	82.2
TR* de métal dans les effluents avant injection de bactérie (%)	0.00	18.9	0.00	11.1
TR* de métal dans les effluents après injection de bactérie (%)	0.57	63.5	0.3	63.0
TR* de métal retenu dans le sable en fin d'essai de transfert (%)	89.3	21.2	97.6	25.7
Bilan de masse métal (%)	89.8	94.7	97.9	88.7

Les Figures V-14 et V-15 présentent les profils verticaux de concentration de Cd et de Zn, aux deux concentrations d'étude, ainsi que les courbes d'élution des deux métaux mesurés lors des expériences de transport en présence de *E. coli* K12DH5a. Les résultats obtenus montrent une modification importante des profils de concentration par rapport aux expériences menées en absence de bactérie. L'injection de cellules de *E. coli* K12DH5a induit une migration en profondeur des deux métaux comme cela avait été observé dans une moindre mesure, pour *C. metallidurans* CH34, indiquant une remobilisation importante des métaux. L'injection de cellules de *E. coli* K12DH5a, sous forme de créneau, induit une forte diminution des teneurs en métaux retenus dans les premiers centimètres et une migration importante du front métallique dans les colonnes. En effet, à la plus faible concentration, on détecte la présence de Cd et de Zn jusque dans les derniers centimètres des colonnes, alors qu'il ne migre pas plus bas que de 8cm sans bactéries. A la plus forte concentration, on observe une forte diminution des quantités de Cd et Zn retenues dans les colonnes en accord avec les résultats précédents. De plus on remarque que le haut de la colonne ne contient quasiment plus de Cd ou de Zn indiquant que les métaux, au passage des cellules, sont remobilisés puis retenus plus profondément et ainsi de suite jusqu'à être élués hors de la colonne. Ces résultats indiquent que les cellules de *E. coli* K12DH5a ont un effet important sur la mobilité du Cd et du Zn retenus dans le sable.

\* TR= Taux de Récupération

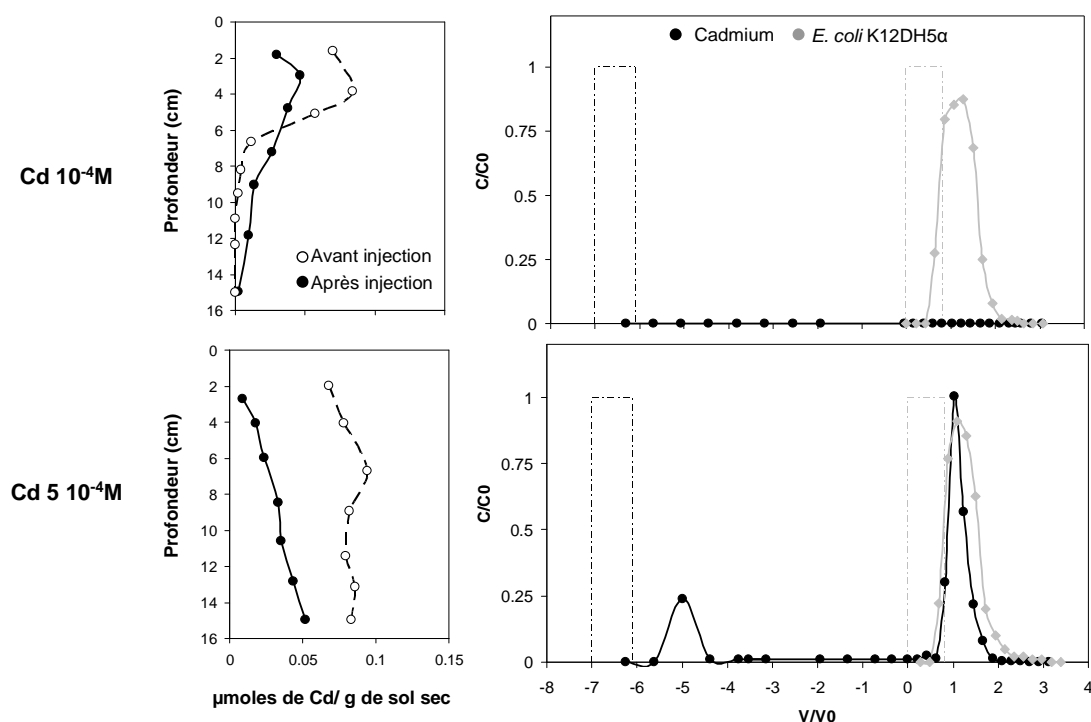


Figure V-14 : Profils verticaux de concentration mesurés de Cd, injectés à  $10^{-4}\text{M}$  et  $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , dans les colonnes de sable d'Hostun avant ( $V/V_0 = 0$ ) et après ( $V/V_0 = 4$ ) injection des cellules de *Escherichia coli* K12DH5α et courbes d'élution du Cd en colonne de sable d'Hostun, injectés à  $10^{-4}\text{M}$  et  $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$  à  $V/V_0 = -7$ , en présence de cellules de *Escherichia coli* K12DH5α injectées à  $10^9$  UFC/mL à  $V/V_0 = 0$ .

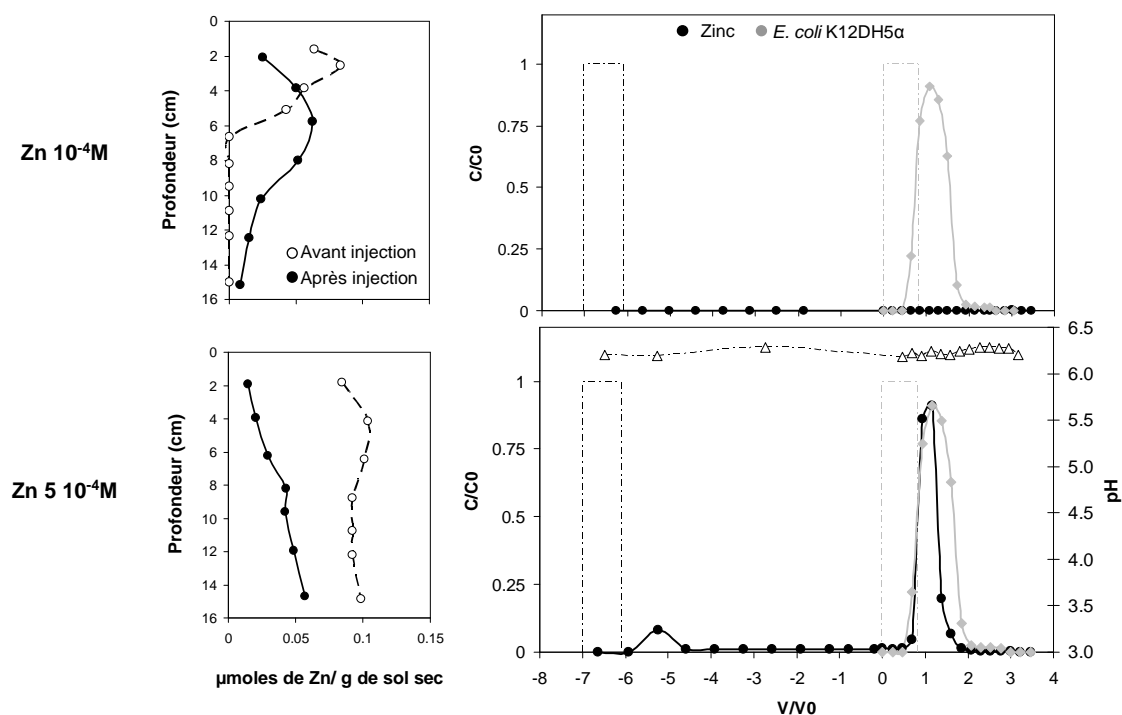


Figure V-15 : Profils verticaux de concentration mesurés de Zn, injectés à  $10^{-4}\text{M}$  et  $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , dans les colonnes de sable d'Hostun avant ( $V/V_0 = 0$ ) et après ( $V/V_0 = 4$ ) injection des cellules de *Escherichia coli* K12DH5α et courbes d'élution du Zn en colonne de sable d'Hostun, injectés à  $10^{-4}\text{M}$  et  $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$  à  $V/V_0 = -7$ , en présence de cellules de *Escherichia coli* K12DH5α injectées à  $10^9$  UFC/mL à  $V/V_0 = 0$ .

Les courbes d'élution montrent qu'à la plus faible concentration testée, l'injection de cellules de *E. coli* K12DH $\alpha$  sous forme d'un crâneau ne permet pas de remobiliser suffisamment les métaux retenus dans la colonne pour lessiver le Cd ou le Zn, comme déjà observé pour *C. metallidurans* CH34. Les résultats montrent qu'à la plus forte concentration métallique, les cellules de *E. coli* K12Dh5 $\alpha$  remobilisent fortement le Cd et le Zn irréversiblement fixé à la matrice sableuse. Environ 45% de Cd et 52% de Zn préalablement retenus sont lessivés après le passage des bactéries. Les courbes de percée montrent que les métaux et les bactéries sortent de la colonne avec le même timing, indiquant un mécanisme de transport facilité de Cd et de Zn par les cellules de *E. coli* K12Dh5 $\alpha$ . De plus, aux deux concentrations d'étude, les deux métaux n'ont pas d'effet significatif sur le transport de *E. coli* K12DH $\alpha$ . En effet, les taux de récupération de cellules de *E. coli* K12DH $\alpha$  mesurés sont proches de ceux mesurés dans le chapitre IV lors des essais de transfert réalisé en absence de métal (Tableau V-6). Des mesures du pH dans les effluents indiquent que les cellules ne semblent pas modifier le pH du milieu.

#### V-5-2-2. Cas du Cd et du Zn en mélange

Le Tableau V-7 présente les conditions expérimentales des essais de transport du Cd et du Zn en mélange réalisées avec injection de cellules de *E. coli* K12Dh5 $\alpha$  dans les colonnes de sable d'Hostun. Les pourcentages de métaux élués ou extraits sont satisfaisants et toujours supérieurs à 94%.

**Tableau V-7: Conditions expérimentales des essais de transfert du Zn et du Cd en mélange réalisés en présence de cellules de *Escherichia coli* K12DH5 $\alpha$  (5 10<sup>8</sup> UFC/mL) et des profils de concentrations des métaux dans les colonnes de sable d'Hostun.**

Métal	Cadmium en mélange		Zinc en mélange	
Volume de pore (mL)	34.1	33.8	34.1	33.8
Volume injecté (mL)	29.5	29.4	29.5	29.4
Quantité de métal injectée (en $\mu$ g)	383	1786	260	1045
Concentration de métal injectée (mol/L)	1.2 10 <sup>-4</sup>	5.4 10 <sup>-4</sup>	1.3 10 <sup>-4</sup>	5.4 10 <sup>-4</sup>
Concentration de bactérie initiale (UFC/mL)	7.1 10 <sup>8</sup>	1.2 10 <sup>9</sup>	7.1 10 <sup>8</sup>	1.2 10 <sup>9</sup>
Concentration initiale de sites sur les bactéries (moles de sites de surface/L)	4.7 10 <sup>-4</sup>	8.5 10 <sup>-4</sup>	4.7 10 <sup>-4</sup>	8.5 10 <sup>-4</sup>
TR* de bactérie mesuré (%)	74.9	63.7	74.9	63.7
TR* de métal mesuré dans les effluents avant injection de bactérie (%)	0.0	46.8	0.0	49.3
TR* de métal mesuré dans les effluents après injection de bactérie (%)	0.1	82.0	0.03	80.3
TR* de métal retenu dans le sable mesuré en fin d'essai de transfert (%)	98.1	12.6	96.6	15.4
Bilan de masse métal (%)	98.2	94.6	96.6	95.7

\* TR = Taux de Récupération

Les Figures V-16 et V-17 présentent les profils verticaux de concentration de Cd et de Zn, aux deux concentrations d'étude, ainsi que les courbes d'élution des deux métaux mesurés lors des expériences de transport de Cd et de Zn en mélange en présence de *E. coli* K12DH5 $\alpha$ .

L'étude des profils de concentration du Cd et du Zn après l'injection de *E. coli* K12DH5 $\alpha$ , montre qu'à la plus faible concentration, la présence des bactéries entraîne une remobilisation importante du Cd et du Zn préalablement retenus dans les colonnes, qui se traduit par un déplacement en profondeur des deux métaux, comme observé avec les essais réalisés en conditions mono-métalliques. Les profils de concentration du Cd et du Zn mesurés pour la plus forte concentration d'injection, confirment l'effet important des cellules de *E. coli* K12DH5 $\alpha$  sur la mobilité du Cd et du Zn, injectés en mélange, dans les colonnes de sable d'Hostun. En effet après le passage des bactéries, il ne reste plus qu'une faible quantité de métal retenu dans les colonnes et principalement dans les derniers centimètres. Il serait intéressant de savoir si cette quantité est retenue sur la matrice et si elle est retenue par les cellules bactériennes, elles-mêmes retenues sur le sable, ou si l'injection d'un nouveau créneau de bactéries permettrait de lessiver la totalité des métaux.

Les Figures V-16 et V-17 montrent que l'injection de cellules de *E. coli* K12DH5 $\alpha$  ne permet pas d'induire l'élution du Zn et du Cd injectés en mélange, à la plus faible concentration, comme cela a déjà été observé avec les métaux seuls. Les résultats obtenus à la plus forte concentration métallique confirment que les cellules de *E. coli* K12DH5 $\alpha$  sont capables de remobiliser fortement le Zn et le Cd en mélange jusqu'à élution de 31 % et de 36 % du Zn et du Cd irréversiblement retenus dans les colonnes, respectivement. Après le passage des cellules de *E. coli* K12DH5 $\alpha$ , il ne reste plus qu'environ 15% de Zn et 12 % de Cd initialement injectés dans la colonne, indiquant une forte capacité de remobilisation des métaux par les cellules de *E. coli* K12DH5 $\alpha$  dans nos conditions d'étude. On note que les deux métaux sont biolixiviés de manière similaire et se déplacent à la même vitesse que les bactéries. A la plus forte concentration, on observe que la présence de Cd et de Zn en mélange induit un effet néfaste sur le transport de *E. coli* K12DH5 $\alpha$ . On observe, en effet, une diminution du taux de récupération des cellules d'environ 20% indiquant une augmentation de la rétention des cellules bactériennes. Ce phénomène a déjà été observé par Guiné (2006) et en accord avec la plus forte sensibilité de *E. coli* K12DH5 $\alpha$  vis-à-vis des métaux. La présence des deux métaux en mélange, à cette concentration, ne modifie pas le transport des cellules de *E. coli* K12DH5 $\alpha$ .

Pour toutes les conditions testées, les deux métaux présentent des profils et des courbes de percée proches, indiquant à nouveau des mécanismes de transport similaires dans les conditions d'étude. Ceci indique que les cellules de *E. coli* K12DH5 $\alpha$  ne modifient pas spécifiquement la mobilité du Cd ou du Zn lorsqu'ils sont en mélange, mais ont plutôt un effet global de biosorption et/ou de lixiviation indirecte des deux métaux.

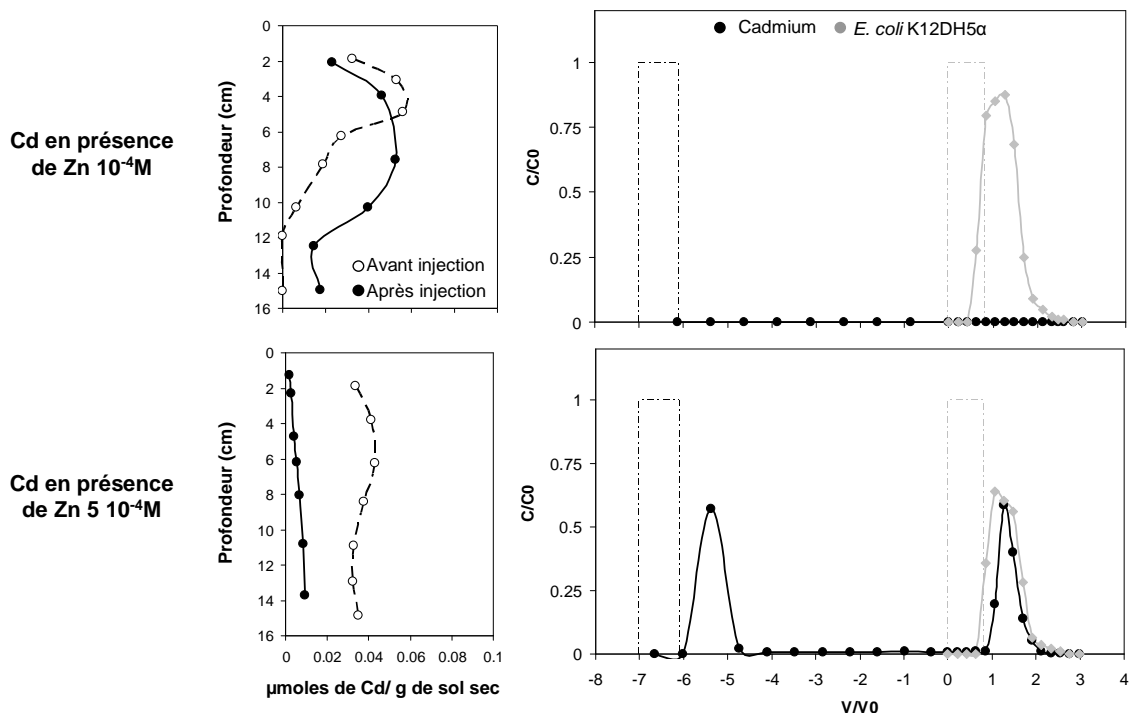


Figure V-16: Profils verticaux de concentration mesurés de Cd, injectés en mélange à  $10^{-4}\text{M}$  et  $5 \times 10^{-4}\text{M}$ , dans les colonnes de sable d'Hostun avant ( $V/V_0 = 0$ ) et après ( $V/V_0 = 4$ ) injection des cellules de *Escherichia coli* K12DH5a et courbes d'élution du Cd en colonne de sable d'Hostun, injectés en mélange à  $10^{-4}\text{M}$  et  $5 \times 10^{-4}\text{M}$  à  $V/V_0 = -7$ , en présence de cellules de *Escherichia coli* K12DH5a injectées à  $10^9$  UFC/mL à  $V/V_0 = 0$ .

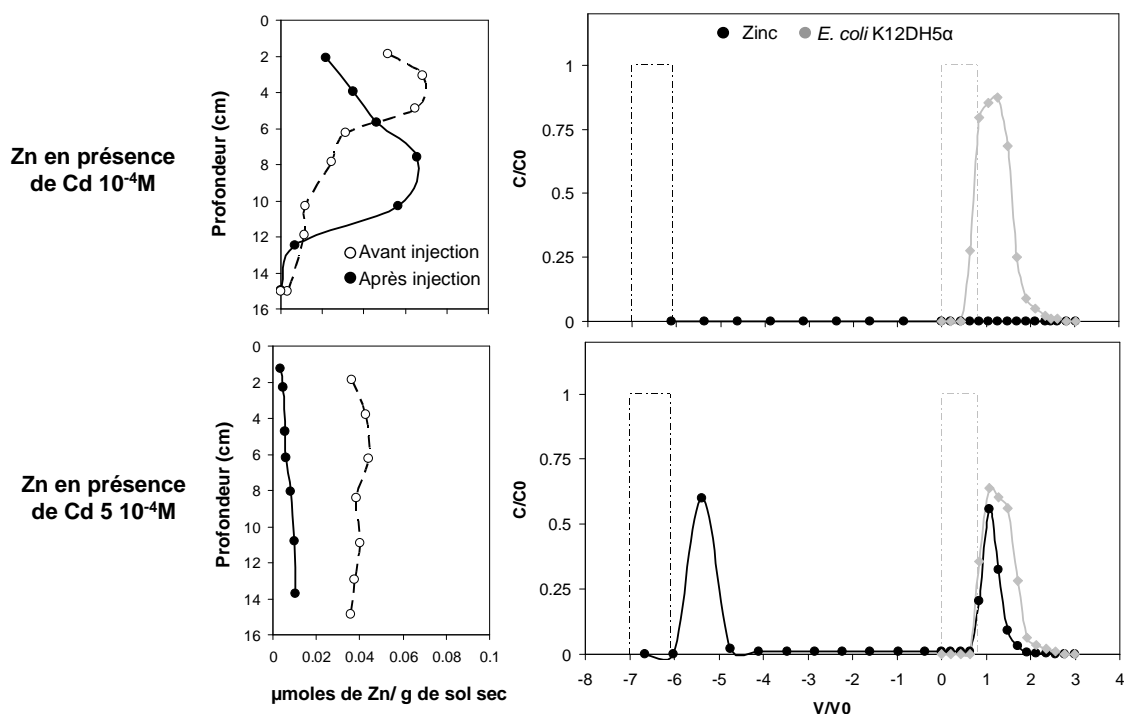


Figure V-17 : Profils verticaux de concentration mesurés de Cd, injectés en mélange à  $10^{-4}\text{M}$  et  $5 \times 10^{-4}\text{M}$ , dans les colonnes de sable d'Hostun avant ( $V/V_0 = 0$ ) et après ( $V/V_0 = 4$ ) injection des cellules de *Escherichia coli* K12DH5a et courbes d'élution du Cd en colonne de sable d'Hostun, injectés en mélange à  $10^{-4}\text{M}$  et  $5 \times 10^{-4}\text{M}$  à  $V/V_0 = -7$ , en présence de cellules de *Escherichia coli* K12DH5a injectées à  $10^9$  UFC/mL à  $V/V_0 = 0$ .

## V-6. Modélisation du transport facilité des métaux par les bactéries

### V-6-1. Modélisation du transport des bactéries en colonne de sable d'Hostun

La Figure V-18 représente l'évolution de la masse normalisée ( $M_{\text{éluee}}/M_{\text{tot}}$ ) des bactéries considérées comme des ligands dissouts réactifs en fonction de  $V/V_0$  à partir des résultats présentés dans le chapitre IV à des concentrations cellulaires de  $10^9$  et  $4 \cdot 10^8$  UFC/mL pour *E. coli* K12DH5 $\alpha$  et *C. metallidurans* CH34, respectivement. Deux paramétrisations ont été testées : une première où l'on considère qu'il n'y a qu'un seul type de sites de rétention des ligands bactériens au niveau de la matrice, et une seconde où l'on considère qu'il existe deux type de sites de rétention de densité et d'affinité différente.

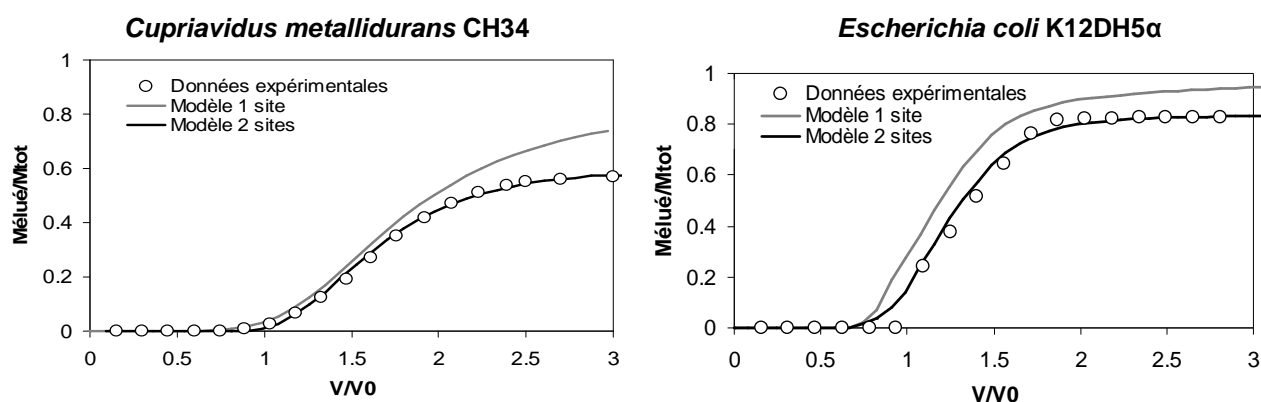


Figure V-18 : Evolution de la masse normalisée des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 ( $5 \cdot 10^8$  UFC/mL) et de *Escherichia coli* K12DH5 $\alpha$  ( $10^9$  UFC/mL) éluée des colonnes de sable d'Hostun en fonction de  $V/V_0$ .

L'atteinte du plateau à  $M_{\text{éluee}}/M_{\text{tot}} = 0.6$  et  $M_{\text{éluee}}/M_{\text{tot}} = 0.85$  pour *C. metallidurans* CH34 et *E. coli* K12DH5 $\alpha$ , respectivement, signifie qu'il y a une rétention irréversible des ligands bactériens dans la colonne. On note que le modèle avec un seul site réactif n'arrive pas à reproduire correctement le fléchissement de la courbe au plateau  $M_{\text{éluee}}/M_{\text{tot}}$ . Ces résultats indiquent donc qu'il existe au moins deux types de sites réactifs pour les bactéries modèles dans le sable d'Hostun correspondant à une rétention réversible et irréversible, comme observé au Chapitre IV, avec les bilans de masse des courbes et les facteurs de retard. Pour représenter cela nous avons donc introduit dans la modélisation un second type de sites de rétention au niveau de la matrice solide associé à un pK élevé représentant les sites de fixation irréversible ( $S_{bi}$ ). Par la suite, nous avons donc modélisé le transport des 2 bactéries modèles en considérant deux sites de rétention, l'un de forte et l'autre de faible affinité représentant les interactions irréversibles et réversibles, respectivement. Les deux valeurs de pK ainsi que les deux concentrations totales ont été ajustées avec les données de la Figure IV-17 et les courbes obtenues sont présentées dans la Figure V-19.

Dans le chapitre IV, nous avons observé par ailleurs que les profils de rétention des cellules bactériennes ne sont pas homogènes le long de la colonne et présentent une forme hyper-exponentielle. Afin de modéliser les profils de rétention observés dans le Chapitre IV, nous avons distribué les sites de fixation de manière non homogène le long des colonnes de sable d'Hostun. En pratique, la densité de site  $T_{Sb}$  et  $T_{Sbi}$  est plus importante dans les

premières cellules du modèle et décroît avec la profondeur afin de simuler au mieux les observations expérimentales.

Avec ces nouvelles constantes simulant les processus de rétention réversible et irréversible, et la prise en compte de l'hétérogénéité de rétention le long de la colonne de sable, nous parvenons à simuler de manière satisfaisante le transport des deux bactéries dans les colonnes (Figure V-19). Un exemple de script PhreeqC, correspondant à la modélisation du transport du Cd par les cellules de *E. coli* K12DH5α est présenté en annexe 6.

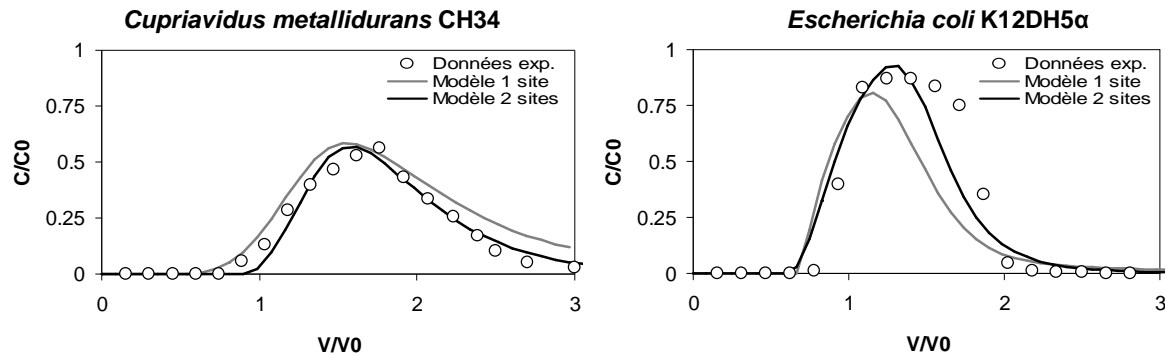


Figure V-19 : Courbes de percées observées et calculées des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 ( $5 \cdot 10^8$  UFC/mL) et de *Escherichia coli* K12DH5α ( $10^9$  UFC/mL) en colonne de sable. Les lignes continues correspondent aux données modélisées avec un modèle hydrogéochimique sous PhreeqC en considérant la rétention des bactéries sur un (ligne grise) ou deux sites réactifs (ligne noire).

La modélisation des systèmes simples matrice - métal ou matrice - bactérie a ainsi été paramétrée pour nos conditions d'étude. Dans les paragraphes suivants, nous présenterons les résultats de modélisation combinant les trois composantes : matrice, métaux et bactéries. La modélisation associée utilisera les paramètres décrits précédemment pour les interactions entre la matrice et les ligands bactériens et entre la matrice et les métaux. Nous avons fait le choix, pour des raisons de simplification, de ne modéliser la biosorption des métaux sur les cellules bactériennes qu'avec un seul type de sites réactifs (Cc). La densité de ce type global de sites correspondant à la somme des densités des trois groupements fonctionnels déterminées à partir des titrations acides bases et des isothermes de sorption du Tableau V-8. La densité de ligands bactériens utilisée dans notre étude est de 1.09 et de 0.57 moles de sites  $g^{-1}$  MS pour *C. metallidurans* CH34 et *E. coli* K12DH5α, respectivement.

Tableau V-8: Constantes de déprotonation et de complexation des métaux sur les cellules bactériennes de *Cupriavidus metallidurans* CH34 et de *Escherichia coli* K12DH5α (d'après Guiné, 2006).

	Echange de proton $R-XH \leftrightarrow R-X^- + H^+$			Complexation du Cd $R-X^- + Cd^{2+} \leftrightarrow R-XCd^+$			Complexation du Zn $R-X^- + Zn^{2+} \leftrightarrow R-XZn^+$		
	$pK_C/[T_{CH}]^2$	$pK_P/[T_{PH}]^2$	$pK_N/[T_{NH}]^2$	$\log K_{CCd}$	$\log K_{PCd}$	$\log K_{NCd}$	$\log K_{CZn}$	$\log K_{PZn}$	$\log K_{NZn}$
<b>C. metallidurans CH34</b>	3,5/0,42	6,7/0,12	9/0,45	3,6	4,7	5,0	2,2	4,2	5,6
<b>E. coli K12DH5α</b>	4,2/0,25	6,8/0,07	8,8/0,25	4,4	5,0	5,9	3,5	5,5	6,7

Les constantes de complexation des métaux sur les sites Cc des cellules bactériennes, ont été ajustées sur les données expérimentales des essais de transfert du Cd et du Zn en présence des deux bactéries modèles, en comparant les courbes d'élution mesurées et modélisées, de manière à ce que les bilans de masse modélisés des métaux élués en présence

des bactéries soit proches de ceux mesurés. Elles ont ensuite été comparées aux constantes déterminées lors des expériences de biosorption (Chapitre III) et isothermes d'adsorption (Tableau V-8).

## V-6-2. Modélisation des courbes de percée des métaux et bactéries

### V-6-2-1. Cas des pollutions mono-métalliques

Les Tableaux V-9 et V-10 présentent les paramètres ajustés et les résultats de la modélisation des essais de transfert du Cd et du Zn en présence des cellules de *C. metallidurans* CH34 et de *E.coli* K12DH $\alpha$ , respectivement, en colonnes de sable d'Hostun.

**Tableau V-9 : Paramètres de modélisation calés par l'ajustement des courbes de percée et des profils de rétention du zinc ou du cadmium, en présence de cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 dans les colonnes de sable d'Hostun.**

Métal	Cadmium		Zinc	
[métal] injectée (mol/L)	1.0E-04	5.3E-04	1.1E-04	5.2E-04
[bactérie] initiale (UFC/mL)	4.4E+08	4.0E+08	6.6E+08	4.0E+08
[bactérie] initiale (mol sites réactifs/L)	2.4E-04	2.0E-04	4.6E-04	2.0E-04
Constante de complexation métal-bactérie (Cc-1 + Me+2 $\rightleftharpoons$ CcMe)	6.0	6.0	6.0	6.0
TR* de bactérie modélisé (%)	69.3	61.7	83.4	60.5
TR* de métal modélisé dans les effluents avant injection de bactérie (%)	0.0	22.4	0.0	17.1
TR* de métal modélisé dans les effluents après injection de bactérie (%)	0.0	25.6	0.0	20.5

**Tableau V-10 : Paramètres de modélisation calés par l'ajustement des courbes de percée et des profils de rétention du zinc ou du cadmium, en présence de cellules de *Escherichia coli* K12DH5 $\alpha$  dans les colonnes de sable d'Hostun.**

Métal	Cadmium		Zinc	
[métal] injectée (mol/L)	8.9E-05	5.4E-04	1.3E-04	5.0E-04
[bactérie] initiale (UFC/mL)	1.0E+09	1.1E+09	9.0E+08	1.2E+09
[bactérie] initiale (mol sites réactifs/L)	7.2E-04	7.6E-04	6.2E-04	8.2E-04
Constante de complexation métal-bactérie (Cc-1 + Me+2 $\rightleftharpoons$ CcMe)	8.7	8.7	8.6	8.6
TR* de bactérie modélisé (%)	85.1	85.4	87.2	85.7
TR* de métal modélisé dans les effluents avant injection de bactérie (%)	0.0	24.0	0.0	15.3
TR* de métal modélisé dans les effluents après injection de bactérie (%)	0.1	71.2	1.4	76.8

\* TR = Taux de Récupération



L'application de notre modèle hydrogéochimique sous PhreeqC permet de reproduire de manière satisfaisante les courbes d'élution des deux métaux et des deux bactéries modèles. Les paramètres de modélisation, notamment concernant les constantes de réactions entre les cellules bactériennes et les métaux ayant été ajustées pour correspondre au mieux aux données expérimentales, il est logique d'obtenir des bilans de masse modélisés proches de ceux mesurés. La Figure V-20 et la Figure V-21 montrent que notre modélisation couplée permet de simuler de manière satisfaisante les courbes de percée des bactéries modèles et des deux métaux avant et après le passage des bactéries. En effet le modèle reproduit bien le lessivage des métaux et notamment leur temps de sortie qui est très proche de celui des bactéries, ce qui plaide fortement pour un mécanisme de co-transfert. Les bilans de masse calculés sont proches de ceux mesurés lors des expériences (Tableau V-4). On remarque que les constantes de complexation métaux-bactéries ajustées sont supérieures à celle déterminées à partir des isothermes de sorption pour les deux bactéries (Tableaux V-9 et V-10). Afin de reproduire correctement le lessivage des métaux induit par l'injection des cellules bactériennes, la valeur de ces constantes a dû être augmentée, indiquant que la biosorption des métaux sur les cellules bactériennes ne suffit pas à expliquer les effets de transport facilité observés. Ceci indique un probable effet indirect des cellules sur le transport des métaux, notamment par des modifications des conditions de la géochimie de la solution et remet également en cause la conceptualisation ainsi que la robustesse du modèle choisi..

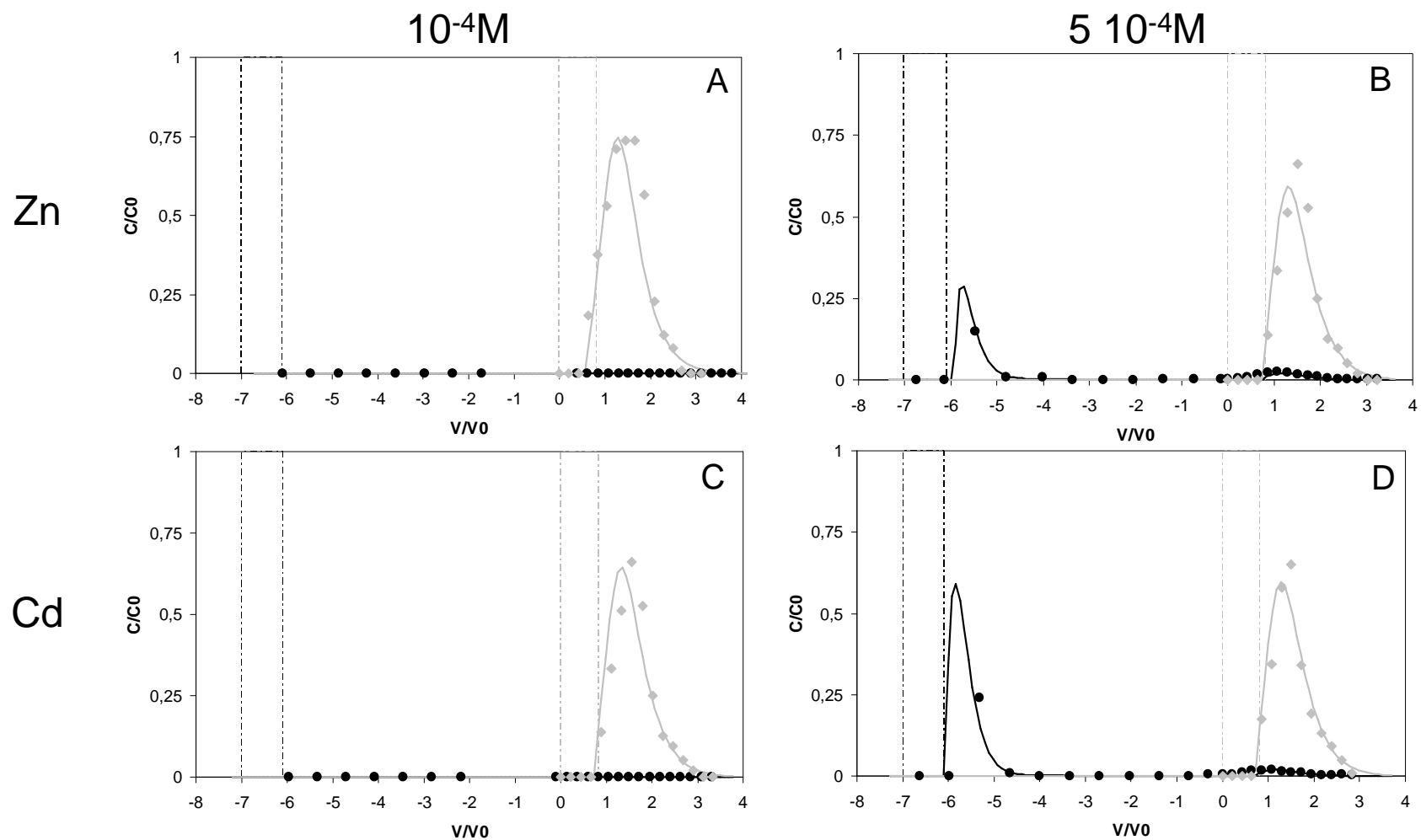


Figure V-20 : Courbes d'élution observées (symboles) et calculées (lignes) du Zn à  $10^{-4}M$  (A) et à  $5 \cdot 10^{-4}M$  (B) et du Cd à  $10^{-4}M$  (C) et à  $5 \cdot 10^{-4}M$  (D) (en noir) avant et après injection de cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 (en gris) injectées à  $4 \cdot 10^8$  UFC/mL à  $V/V_0 = 0$ .

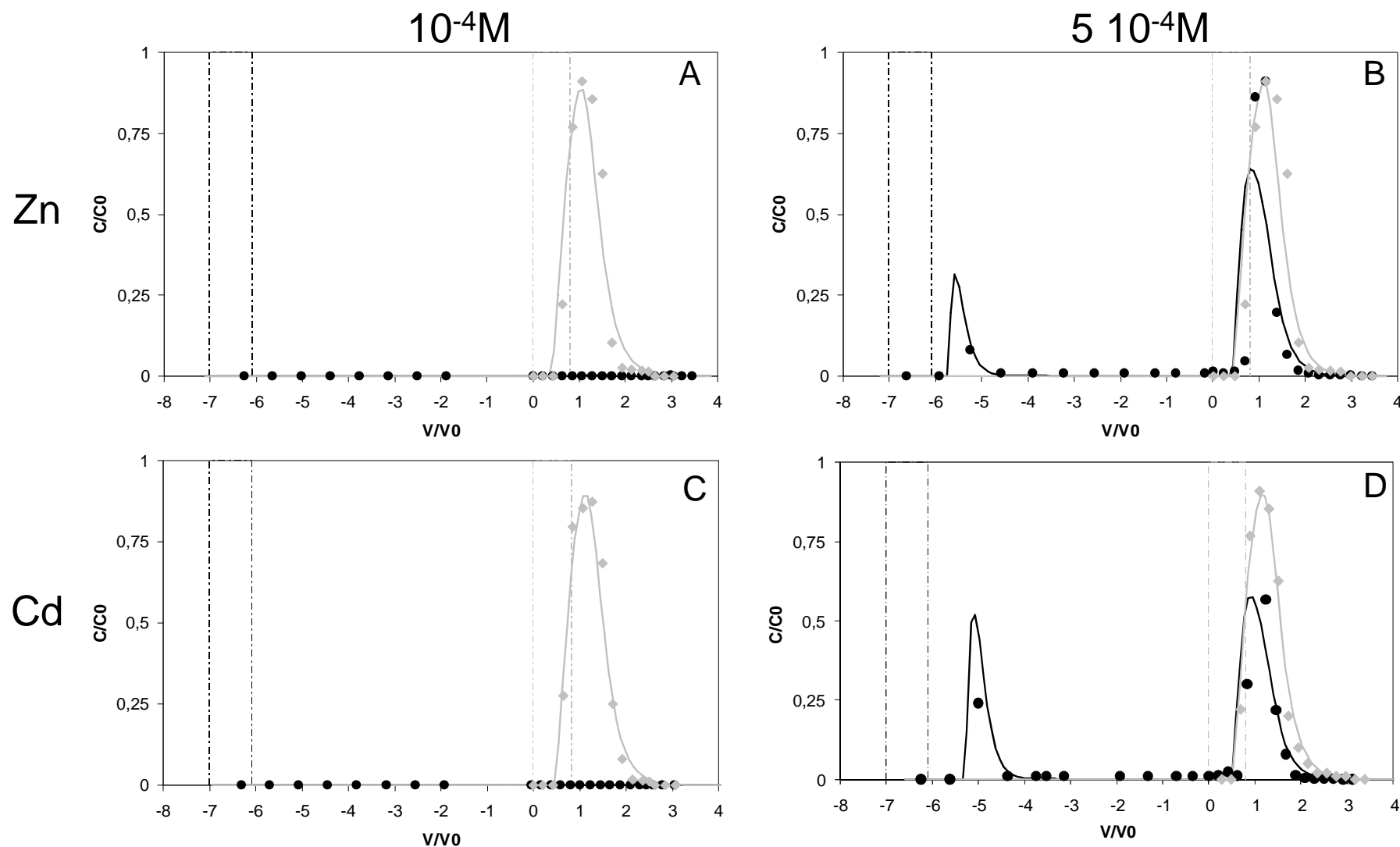


Figure V-21 : Courbes d'élution observées (symboles) et calculées (lignes) du Zn à  $10^{-4}M$  (A) et à  $5 \cdot 10^{-4}M$  (B) et du Cd à  $10^{-4}M$  (C) et à  $5 \cdot 10^{-4}M$  (D) (en noir) avant et après injection de cellules de *Escherichia coli* K12DH5a (en gris) injectées à  $10^9$  UFC/mL à  $V/V_0 = 0$ .

### V-6-2-2. Cas du Cd et du Zn en mélange

Le Tableau V-11 et le Tableau V-12 présentent les paramètres ajustés et les résultats de la modélisation des essais de transfert du Cd et du Zn en mélange en présence de cellules de *C. metallidurans* CH34 ou de *E. coli* K12DH $\alpha$ , respectivement, en colonne de sable d'Hostun.

**Tableau V-11 : Paramètres de modélisation calés par l'ajustement des courbes de percée e et des profils de rétention du zinc ou du cadmium en mélange, après injection de cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 dans les colonnes de sable d'Hostun.**

Métal	Cadmium (mélange)		Zinc (mélange)	
[métal] injectée (mol/L)	1.1E-04	5.1E-04	1.3E-04	5.1E-04
[bactérie] initiale (UFC/mL)	4.7E+08	3.9E+08	4.7E+08	3.9E+08
[bactérie] initiale (mol sites réactifs/L)	2.8E-04	2.2E-04	2.8E-04	2.2E-04
Constante de complexation métal-bactérie (Cc-1 + Me+2 $\rightleftharpoons$ CcMe)	6.0	6.0	6.0	6.0
TR <sup>*</sup> de bactérie modélisé (%)	72.6	67.1	72.6	67.1
TR <sup>*</sup> de métal modélisé dans les effluents avant injection de bactérie (%)	0.0	68.7	0.0	68.7
TR <sup>*</sup> de métal modélisé dans les effluents après injection de bactérie (%)	0.0	69.4	0.0	69.4

**Tableau V-12 : Paramètres de modélisation calés par l'ajustement des courbes de percée e et des profils de rétention du zinc ou du cadmium en mélange, après injection de cellules de *Escherichia coli* K12DH5 $\alpha$  dans les colonnes de sable d'Hostun.**

Métal	Cadmium (mélange)		Zinc (mélange)	
[métal] injectée (mol/L)	1.2E-04	5.4E-04	1.4E-04	5.4E-04
[bactérie] initiale (UFC/mL)	7.1E+08	1.2E+09	7.1E+08	1.2E+09
[bactérie] initiale (mol sites réactifs/L)	4.7E-04	8.5E-04	4.7E-04	8.5E-04
Constante de complexation métal-bactérie (Cc-1 + Me+2 $\rightleftharpoons$ CcMe)	8.7	8.7	8.6	8.6
TR <sup>*</sup> bactérie modélisé (%)	63.8	75.7	63.8	75.7
TR <sup>*</sup> de métal modélisé dans les effluents avant injection de bactérie (%)	0.0	58.1	0.0	58.1
TR <sup>*</sup> de métal modélisé dans les effluents après injection de bactérie (%)	2.1	87.4	4.7	92.9

Les figures V-22 et V-23 montrent que d'une manière générale le modèle reproduit correctement les courbes d'élution du Cd et du Zn, même en conditions de mélange, avant et après injection des bactéries. Toutefois, on remarque qu'avec *E. coli* K12DH5 $\alpha$ , la forme des courbes d'élution des cellules n'est pas très bien reproduite par le modèle indiquant qu'un ou

\* TR = Taux de récupération

plusieurs processus ne sont pas correctement pris en compte par notre modélisation. En revanche, le modèle simule correctement l'élution des métaux à la même vitesse que les cellules bactériennes, confirmant l'effet des bactéries sur la remobilisation des métaux. De plus, le fait que les constantes de complexation entre les métaux et les bactéries ajustées soient très proches pour le Cd et le Zn confirment qu'il n'y pas de transport facilité spécifique du Cd ou du Zn par les cellules bactériennes mais plutôt que les cellules biosorbent de manière indifférente les deux métaux et accélèrent leur transport. Toutefois, on note que le modèle surestime la mobilité des cellules de *E. coli* K12DH5 $\alpha$  dans le sable contaminé par le mélange de Cd et de Zn à la plus forte concentration. Ceci indique que le modèle ne prend pas en compte l'effet de la présence de ces métaux à forte concentration sur la rétention des cellules bactériennes, probablement via une modification des propriétés de surface des grains de sable.

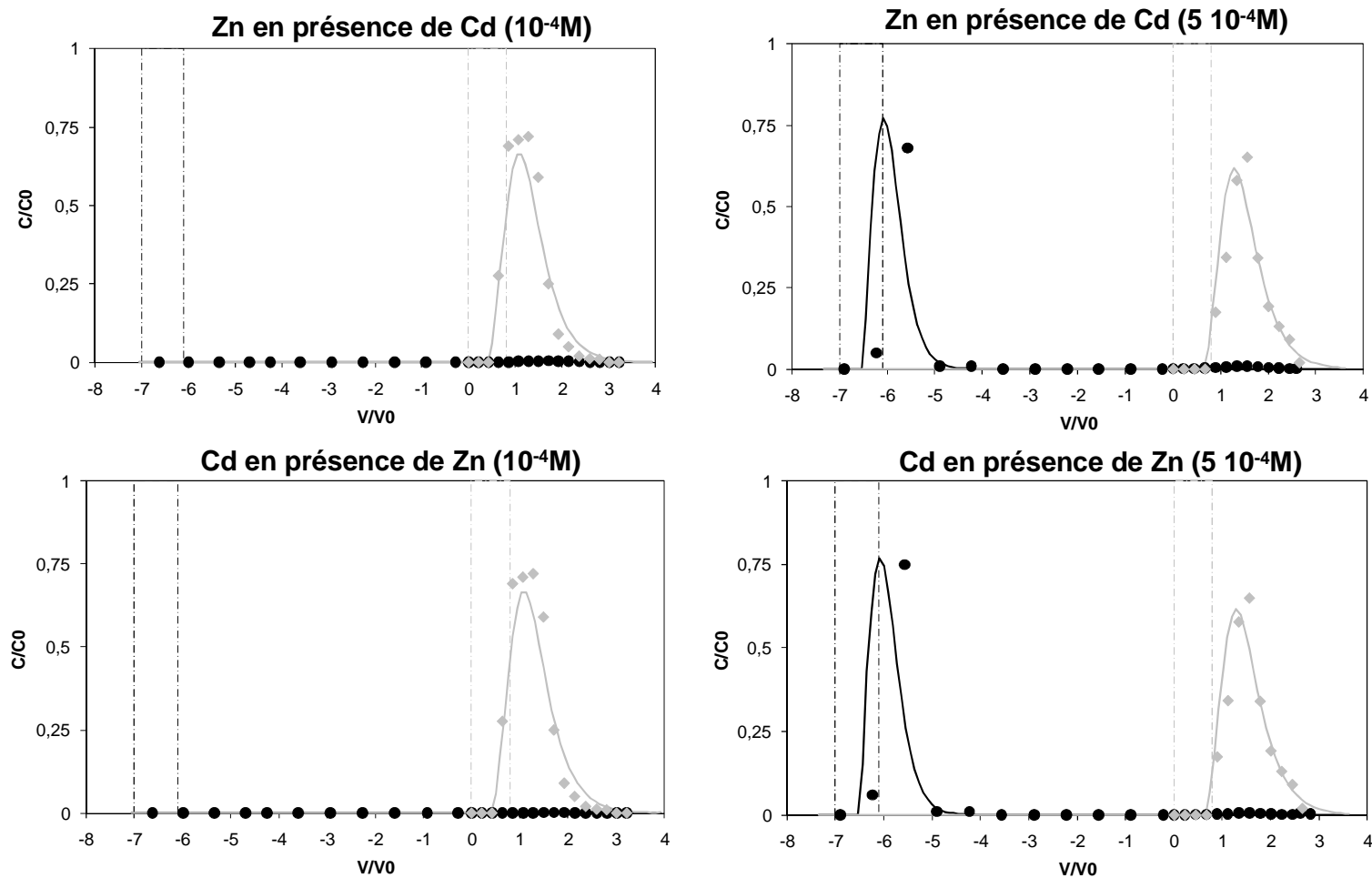


Figure V-22 : Courbes d'élution mesurées et modélisées du Zn injecté à  $10^{-4}M$  (A) et à  $5 \cdot 10^{-4}M$  (B) et du Cd injecté à  $10^{-4}M$  (C) et à  $5 \cdot 10^{-4}M$  (D) à  $V/V_0 = -7$  (en noir), en présence de cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 (en gris) injectées à  $4 \cdot 10^8$  UFC/mL à  $V/V_0 = 0$ . Les symboles correspondent aux données mesurées, les lignes continues correspondent aux données modélisées.

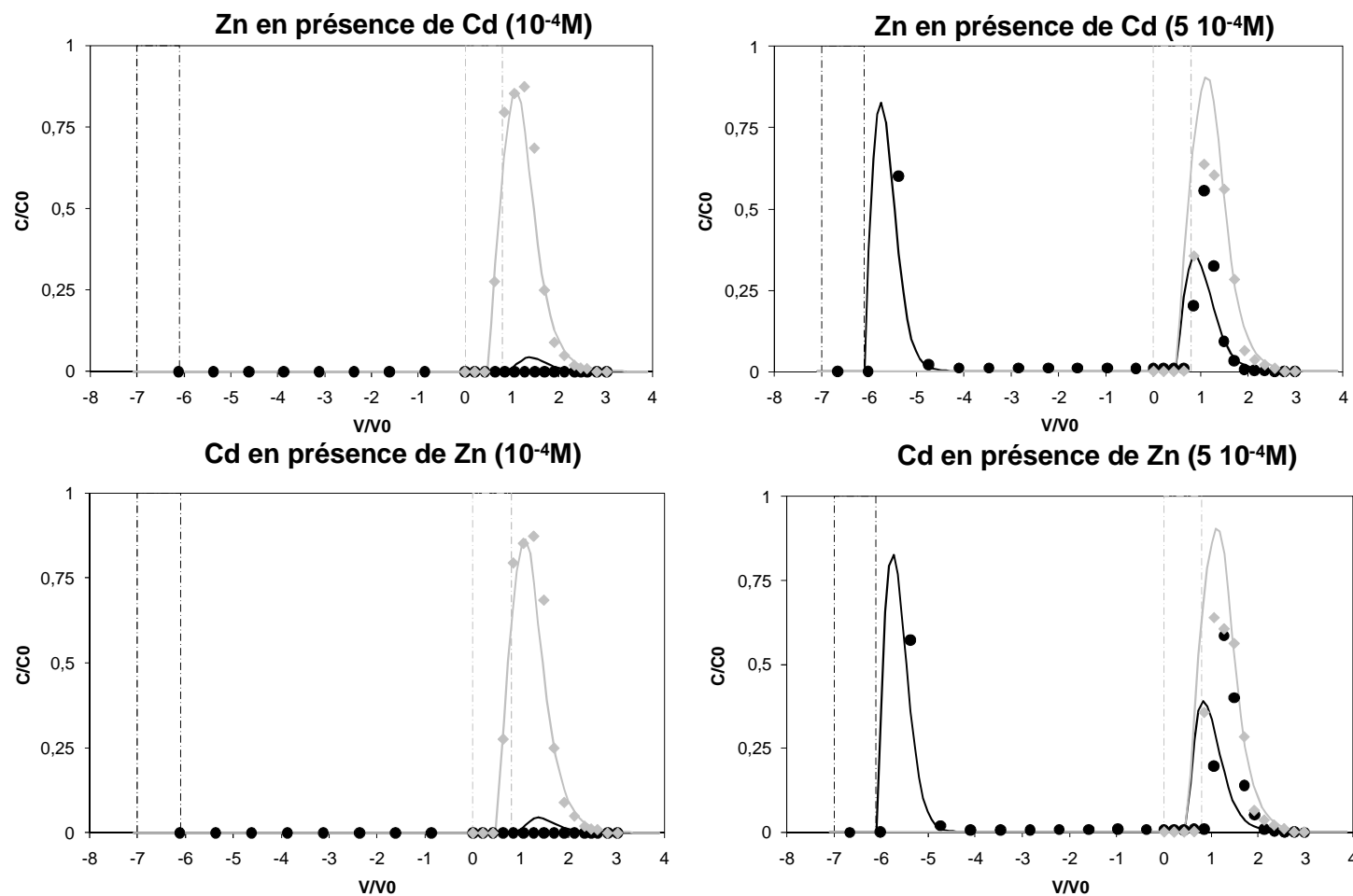
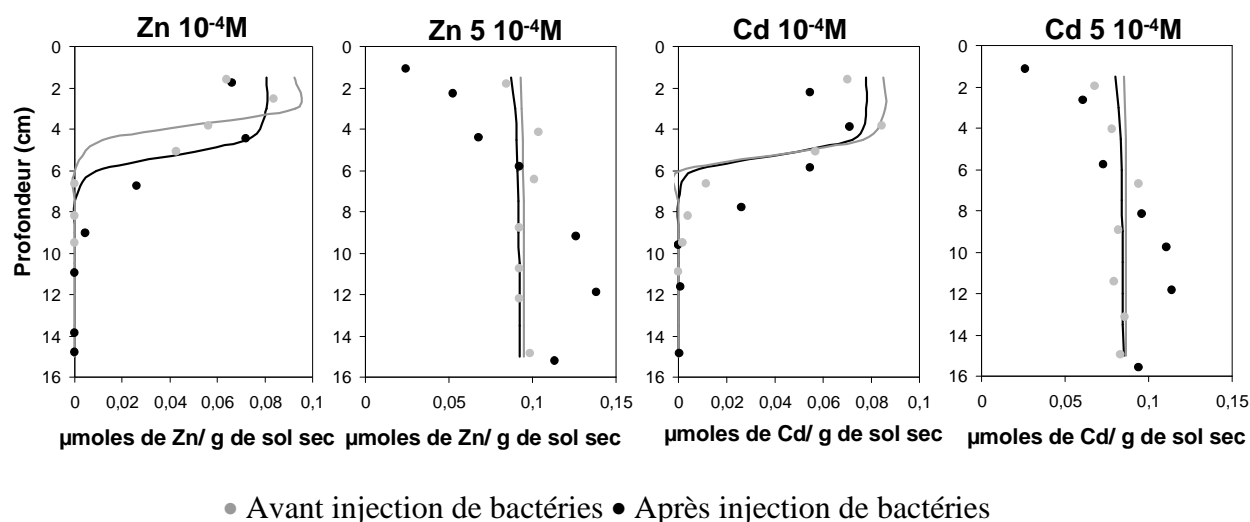


Figure V-23 : Courbes d'élution mesurées et modélisées du Zn à  $10^{-4}M$  (A) et à  $5 \cdot 10^{-4}M$  (B) et du Cd injecté à  $10^{-4}M$  (C) et à  $5 \cdot 10^{-4}M$  (D) à  $V/V_0 = -7$  (en noir), en présence de cellules de *Escherichia coli* K12DH5a (en gris) injectées à  $10^9$  UFC/mL à  $V/V_0 = 0$ . Les symboles correspondent aux données mesurées, les lignes continues correspondent aux données modélisées.

### V-6-3. Modélisation des profils verticaux de rétention des métaux

La modélisation adoptée permet également de reproduire les profils de concentration des métaux retenus dans la colonne en fin d'expérience, mesurés avant ( $V/V_0=0$ ) et après ( $V/V_0=4$ ) l'injection des bactéries. La Figure V-24 présente les profils de concentrations modélisés du Cd et du Zn, injectés seuls, correspondant aux essais de transfert réalisés avec injection de *C. metallidurans* CH34. Même si elle n'est pas parfaite, notre modélisation permet de reproduire de manière satisfaisante les profils de concentrations du Cd et du Zn avant et après l'injection des cellules bactériennes. La seule situation où la modélisation n'est pas entièrement satisfaisante concerne *C. metallidurans* CH34 à forte concentration de métaux indiquant que la conceptualisation retenue n'est pas correcte et néglige un ou des processus importants. En particulier, l'existence de processus indirect de mobilisation des métaux par les bactéries, en plus de la biosorption, ne peut pas être exclue et peut contribuer à modifier la mobilité des métaux. Ceci n'est pas pris en compte dans notre modélisation et constitue donc une perspective importante de ce travail.



**Figure V-24 :** Profils de concentration mesurés et modélisés du Zn et du Cd, injectés seuls à  $10^{-4}\text{M}$  et à  $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , dans les colonnes de sable d'Hostun avant injection des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 à  $V/V_0 = 0$  et après avant injection des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 à  $V/V_0 = 4$ . Les symboles correspondent aux données mesurées, les lignes continues correspondent aux données modélisées.

La Figure V-25 présentent les profils de concentrations du Cd et du Zn, injectés seuls, calculés à partir des essais de transfert réalisés avec injection de *E. coli* K12DH5a. Notre modélisation couplée permet de reproduire de manière satisfaisante les profils de concentration du Cd et du Zn, aux deux concentrations d'étude, avant et après l'injection des cellules de *E. coli* K12DH5a. Ceci indique que les processus modélisés permettent d'expliquer la remobilisation des métaux par *E. coli* K12DH5a. Toutefois, les constantes de complexation des métaux ajustées sont plus importantes que celles déterminées expérimentalement (Tableau V-8). Ceci indique que les cellules de *E. coli* K12DH5a transportent les métaux de manière biosorbée, mais aussi que les cellules ont probablement un effet indirect sur le milieu comme observé pour *C. metallidurans* CH34.



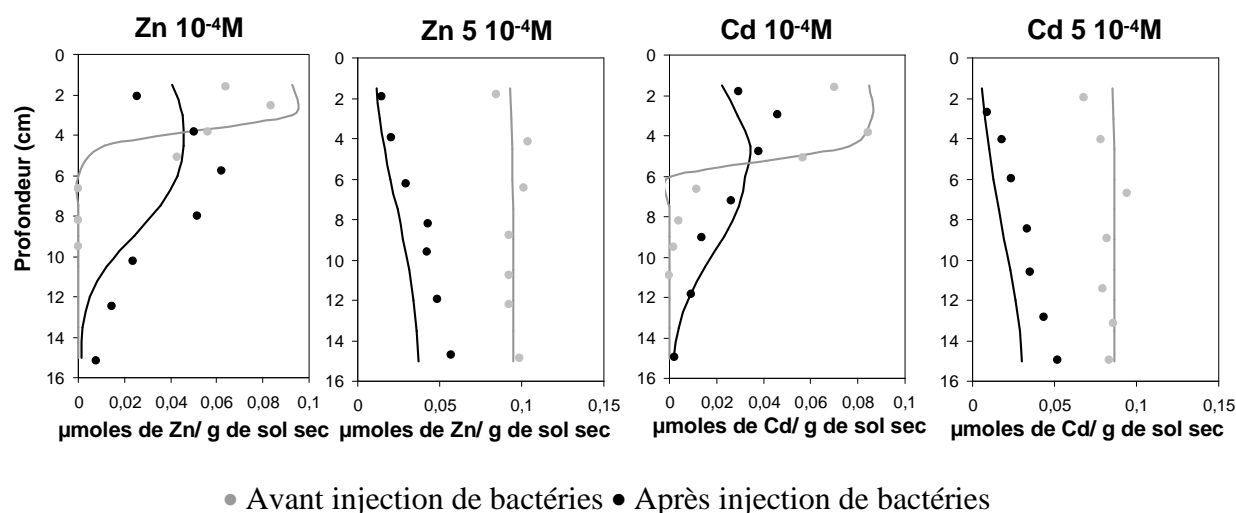


Figure V-25 : Profils de concentration mesurés et modélisés du Zn et du Cd, injectés seuls à  $10^{-4}\text{M}$  et à  $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , dans les colonnes de sable d'Hostun avant injection des cellules de *Escherichia coli* K12DH5a à  $V/VO = 0$  et après avant injection des cellules de *Escherichia coli* K12DH5a à  $V/VO = 4$ . Les symboles correspondent aux données mesurées, les lignes continues correspondent aux données modélisées.

La Figure V-26 et la Figure V-27 présentent les profils verticaux de concentrations du Cd et du Zn, injectés en mélange, calculés à partir des essais de transfert réalisés avec injection de *C. metallidurans* CH34 et de *E. coli* K12DH $\alpha$ , respectivement. Dans ces conditions le modèle reproduit plus difficilement les profils de concentration des métaux, ce qui indique l'existence probable d'interactions entre le Zn et le Cd, non prises en compte par le modèle. Comme précédemment, le modèle ne parvient pas à reproduire correctement la mobilisation des métaux à la plus forte concentration sous l'effet des cellules de *C. metallidurans* CH34 contrairement à celui de *E. coli* K12DH $\alpha$ .

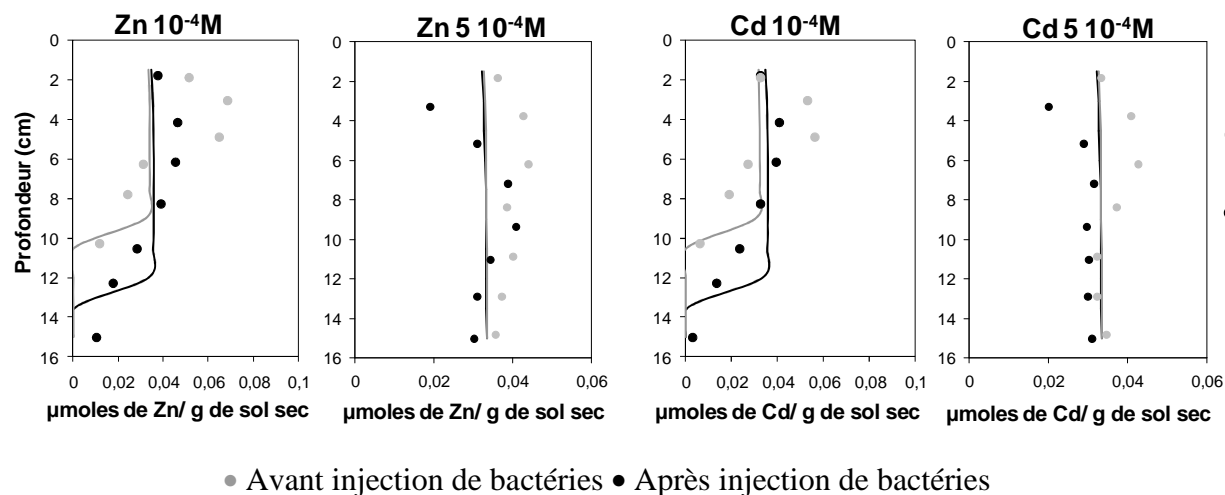
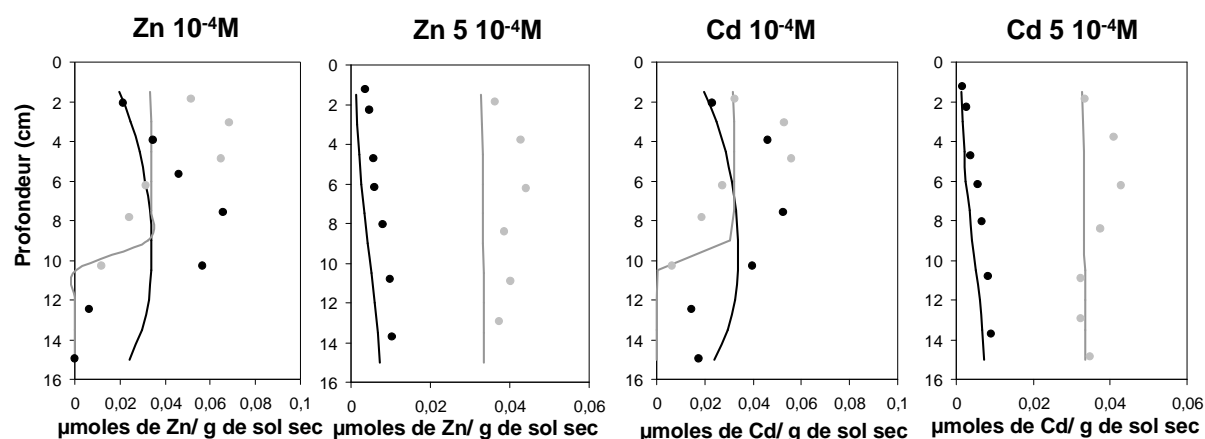


Figure V-26 : Profils de concentration mesurés et modélisés du Zn et du Cd, injectés en mélange à  $10^{-4}\text{M}$  et à  $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , dans les colonnes de sable d'Hostun avant injection des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 à  $V/VO = 0$  et après avant injection des cellules de *Cupriavidus metallidurans* CH34 à  $V/VO = 4$ . Les symboles correspondent aux données mesurées, les lignes continues correspondent aux données modélisées.



• Avant injection de bactéries • Après injection de bactéries

Figure V-27 : Profils de concentration mesurés et modélisés du Zn et du Cd, injectés en mélange à  $10^{-4}\text{M}$  et à  $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , dans les colonnes de sable d'Hostun avant injection des cellules de *Escherichia coli* K12DH5a à  $V/VO = 0$  et après avant injection des cellules de *Escherichia coli* K12DH5a à  $V/VO = 4$ . Les symboles correspondent aux données mesurées, les lignes continues correspondent aux données modélisées.

## V-7. Discussion

### V-7-1. Transfert du zinc et du cadmium en colonne de sable d'Hostun

Les expériences de transport des métaux en absence de bactéries ont permis de montrer que, dans les conditions d'étude, le sable utilisé présente une réactivité importante vis-à-vis des deux métaux modèles. En effet pour les deux concentrations les plus faibles ( $10^{-5}\text{M}$  et  $10^{-4}\text{M}$ ), le Cd et le Zn sont totalement retenus sur la matrice solide. Pour observer l'élution des métaux, il a fallu augmenter les concentrations d'injection jusqu'à  $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ , ce qui a permis de saturer les sites de rétention sur le sable et donc d'observer l'élution des métaux en excès. La forme des courbes d'élution et des profils de rétention sont très proches pour les deux métaux indiquant des mécanismes de transport réactifs similaires, avec toutefois une mobilité légèrement supérieure pour le cadmium dans ce sable. Les paramètres utilisés pour modéliser le transport du cadmium et du zinc permettent de simuler le transport des deux métaux modèles de manière satisfaisante dans les colonnes de sable d'Hostun (Figure V-7 et Tableau V-7). Les paramètres hydrodynamiques et de sorption ajustés ont permis de représenter correctement les résultats expérimentaux pour les trois concentrations d'étude avec un seul jeu de paramètres. Le choix de représenter dans la modélisation la réactivité de la matrice avec un seul type de sites de fixation des 2 métaux est donc acceptable dans nos conditions de transport des métaux et en absence de bactéries. Les mécanismes de transport réactif des métaux sont relativement simples puisqu'on n'observe pas d'interactions réversibles avec le sable mais uniquement des interactions irréversibles. Les sites de rétention sont saturés progressivement le long de la colonne et on observe l'élution de métaux uniquement lorsque la quantité de Cd et de Zn injectée est supérieure à la quantité globale de sites de fixations (Figure V-7). Dans ce cas, on observe une migration rapide des métaux sans retard par rapport à l'eau.

Une des originalités de ce travail concerne l'étude du transfert de métaux en mélange en milieu poreux réactif, ce qui est encore peu étudié. Nous avons observé que la présence de

cations compétiteurs modifie le transport des métaux lourds par rapport au cas où ils sont injectés seuls. Ceci s'explique d'une part par une compétition pour les sites de rétention au niveau de la matrice, tel que cela a déjà été observé en batch mais rarement en conditions hydrodynamiques en colonnes. Du fait de cette compétition entre le Zn et le Cd pour les sites de sorption, chaque métal étant moins susceptible de se fixer à la matrice on observe alors une augmentation de leur transport réactif le long de la colonne, ce qui conduit à une augmentation des masses de métaux éluées. Les résultats de modélisation sont satisfaisants et permettent aussi de calculer correctement les masses de métaux transportées. Toutefois, la forme des courbes de percée modélisée n'est pas toujours parfaitement reproduite par le modèle indiquant que le modèle, même s'il donne une bonne estimation du comportement des métaux, n'intègre pas tous les mécanismes d'interaction entre les deux métaux et le sable.

### **V-7-2. Etude et modélisation de l'effet des bactéries sur le transport du cadmium et du zinc, seuls ou en mélange, en colonne de sable d'Hostun**

Nos résultats ont montré que, la présence de cellules bactériennes modifie de manière très similaire le transport du Cd et du Zn, autant en solution mono-métallique qu'en mélange. Toutefois, les deux bactéries semblent présenter des effets différents : la bactérie *C. metallidurans* CH34, malgré sa forte résistance aux métaux, remobilise moins le Cd et le Zn que *E. coli* K12DH5 $\alpha$ . Les mécanismes de remobilisation des 2 métaux semblent différents entre les deux bactéries, probablement à cause de leur différence de mobilité dans le sable d'Hostun. Etant partiellement retenues, les cellules de *C. metallidurans* CH34 participent donc à la rétention des deux métaux. En effet, la présence des cellules de *E. coli* K12DH5 $\alpha$  entraîne une remobilisation importante des deux métaux, puisque près de 50% de la masse des métaux initialement retenue dans la colonne sont élués après l'injection d'un créneau de cellules de *E. coli* K12DH5 $\alpha$  à la plus forte concentration métallique étudiée, contre seulement 1% pour *C. metallidurans* CH34. A la plus faible concentration métallique, bien que l'injection de cellules bactériennes ne permette pas d'éluier le Cd ou le Zn préalablement retenus dans la colonne, il semble que la présence de cellules permettent de faire migrer en profondeur les 2 métaux.

Afin de modéliser le transport facilité des métaux par les bactéries, nous avons d'abord ajusté les paramètres de sorption des métaux en considérant les bactéries comme une somme de ligands modèles dissous qui vont réagir avec la surface du milieu poreux ou rester en solution. Avec la paramétrisation retenue, nous avons pu modéliser le transport des cellules bactériennes dans les colonnes de sable de manière satisfaisante. Pour cela, nous avons dû considérer deux types sites de fixation des bactéries sur le sable, engageant des liaisons réversibles et irréversibles avec les cellules comme cela a déjà été fait avant (Pang et al., 2005; Foppen et al., 2007) pour simuler l'adhésion bactérienne sur les solides. Notre modélisation permet de calculer des bilans de masse et de courbes de percée des bactéries proches des données expérimentales observées.

Afin de modéliser le transport facilité des métaux par les bactéries il a été nécessaire d'ajuster les constantes de complexation entre les cellules et les métaux afin d'obtenir des bilans de masse calculés proches de ceux mesurés lors des expériences de transfert. Les constantes ainsi ajustées permettent de modéliser de manière satisfaisante les courbes d'élution des bactéries et des métaux élués en présence des bactéries, aussi bien en termes de temps de séjour que de masse transportée. Les constantes ajustées pour reproduire au mieux les résultats obtenus lors des essais de transfert, présentent des valeurs supérieures à celles déterminées avec les isothermes de sorption du Cd et du Zn sur les cellules des deux bactéries

modèles (Chapitre II et III) ce qui indique probablement que les mécanismes de transport par biosorption ne sont pas les seuls à intervenir. Nos résultats suggèrent qu'en plus de transporter une partie des métaux de manière biosorbée, les cellules augmentent également la mobilité des métaux via d'autres mécanismes indirects, notamment via des modifications de la géochimie du milieu comme cela a déjà été décrit (Lloyd et al., 2003; Gadd, 2009; Gilmour et Riedel, 2009; Jerez, 2009; Uroz et al., 2009). Pang et al. (2005) ont montré que la présence de cellule d'*E. coli* augmente indirectement la solubilité du Cd alors que les cellules de *B. subtilis* co-transportent le Cd. Guiné (2006) a observé, dans le sable de Fontainebleau, que le mécanisme de transport des métaux biosorbés est dominant avec les cellules de *E.coli* K12Dh5α et que les cellules de *C. metallidurans* CH34 augmentent le transport du zinc et du cadmium plutôt par modification du milieu, en accord avec les résultats obtenus dans notre étude avec un sable beaucoup plus réactif.

Nos résultats ont montré également que la prise en compte simultanée de la rétention des bactéries sur le sable et de la rétention des métaux sur le sable et sur les cellules bactériennes dans le code de calcul PhreeqC, permet de reproduire de manière satisfaisante les profils de concentration des métaux retenus dans les colonnes de sable, aussi bien pour le Cd et le Zn qu'ils soient seuls ou en mélange. Toutefois, le modèle reproduit plus difficilement les profils de concentration des métaux fortement concentrés dans les colonnes après le passage des cellules de *C. metallidurans* CH3 en relation sans doute avec la dominance d'un processus de remobilisation indirecte (non modélisé) des métaux (augmentation de leur solubilité par libération de protons ou ligands forts) par rapport à leur transport biosorbé.

## V-8. Conclusion

Les expériences de transfert des métaux seuls ont montré que bien que relativement simple (composé à plus de 98% de silice), le sable modèle utilisé lors de notre étude présente une réactivité importante vis-à-vis du Cd et du Zn. A faible concentration, les deux métaux modèles sont retenus dans la colonne de manière irréversible et on observe leur lessivage uniquement lorsque la quantité de métal injectée est supérieure à la quantité totale de sites de rétention dans le sable. Cette particularité nous a permis de paramétrer les constantes de sorption entre les métaux et la matrice, qui est représentée par un seul type de site réactif dans notre modélisation hydrogéochimique du transport des métaux. En assimilant les bactéries à un ensemble de ligands modèles dissous, représentés dans notre étude par un seul type de sites réactifs, nous avons pu modéliser de manière satisfaisante le transport des bactéries et des métaux biosorbés. Afin de simuler au mieux le transfert des bactéries, il a été nécessaire de prendre en compte la présence de deux types de sites réactifs au sein de la matrice d'affinité et de densité variables afin de représenter au mieux les mécanismes de sorption réversibles et irréversibles des bactéries observés dans le Chapitre IV.

La paramétrisation des différentes constantes de réaction obtenue avec les essais de transport des métaux et des bactéries seuls, a permis de simuler correctement les résultats de transport de métaux en présence de bactéries. Ainsi pour mettre en évidence l'effet des bactéries sur le transport de métaux, nous avons d'abord contaminé des colonnes de sable avec du Cd et du Zn, seuls ou en mélange, et nous avons ensuite injecté un créneau de bactéries modèles. Les deux bactéries modèles se sont avérées capables de remobiliser les métaux préalablement retenus dans la colonne arrivant même, pour la plus forte concentration, à les éluer hors de la colonne. Les deux bactéries modèles mobilisent les deux métaux, avec une efficacité variable, qu'ils soient seuls ou en mélange. Deux types de mécanismes ont pu être mis en évidence expérimentalement et grâce à la modélisation : un mécanisme direct de transport facilité après biosorption des métaux et un mécanisme indirect

de modification de la géochimie du milieu (solubilisation par production de protons ou de ligands forts solubles...). L'importance de ces deux mécanismes est variable entre les deux bactéries testées, ce qui suggère que chaque espèce bactérienne, peut affecter différemment la mobilité des métaux en conditions naturelles. Dans nos conditions, l'injection de bactéries dans le sable contaminé induit la mobilisation des métaux à la même vitesse que celle des bactéries ce qui indique que ces effets directs ou indirects sont très rapides.

Les deux métaux présentent des propriétés de transport relativement proches et il n'est donc pas étonnant que leur injection en mélange modifie leur mobilité propre en colonne de sable. Les effets de compétition des deux métaux pour les sites de sorption mis en évidence limitent leur rétention et conduisent donc à l'augmentation de leur mobilité. Leur transport associé aux bactéries n'étant pas modifié significativement en conditions de mélange, nos résultats indiquent que l'effet des bactéries sur la mobilité des métaux (transport facilité) n'est pas un phénomène spécifique à un des deux métaux mais plutôt un phénomène global contrôlé par des constantes thermodynamiques de réaction entre les métaux et les sites réactifs non spécifiques des parois cellulaires. Notre étude a donc permis de montrer que les bactéries sont capables, de manière variable et non spécifique, d'accélérer le transport de métaux en milieux contaminés, ce qui ouvre des perspectives importantes en termes de bioremediation et permettra de mieux comprendre et donc prédire le risque de contamination des nappes.

## **CHAPITRE VI   Conclusions et perspectives**



Ce travail de thèse avait pour objectif principal de mieux comprendre le rôle des bactéries dans la sorption et la lixiviation des métaux conduisant à leur mobilisation accélérée dans les milieux poreux naturels. Pour atteindre cet objectif général, nous avons développé une approche couplée divisée en deux parties complémentaires.

Après avoir fait un état de l'art sur la problématique (Chapitre I), nous avons mené dans un premier temps, une étude statique sur la biosorption de deux métaux modèles, le zinc et le cadmium, seuls ou en mélange, par deux bactéries à Gram- modèles, *C. metallidurans* CH34 et *E. coli* K12DH5 $\alpha$ , présentant une sensibilité différente à ces deux métaux. Ainsi, nous avons essayé de caractériser la distribution du Zn et du Cd à l'échelle de la cellule afin de mieux comprendre les mécanismes de prise en charge de ces métaux par les bactéries, qu'elles soient inactives (4°C) (Chapitre II) ou actives (30°C) (Chapitre. III).

Dans un second temps, nous avons mené une étude en conditions dynamiques sur la mobilité des cellules bactériennes en milieu poreux (Chapitre IV) en évaluant en particulier l'effet de différents facteurs sur cette mobilité (effet souche bactérienne, effet du milieu poreux, de la concentration cellulaire ou du mélange de cellules) et sur leur aptitude à biolixivier les métaux modèles, seuls ou en mélange, retenus de manière irréversible dans un sable naturel réactif (Chapitre V).

## **VI-1. Principaux résultats :**

Dans la première partie de ce travail, nous avons visualisé la rétention subcellulaire des métaux par *E. coli* dont le cytoplasme semble être, de manière surprenante, le compartiment le plus susceptible de stocker des métaux. Nous avons également montré, même si cela reste à confirmer, que les cellules de *C. metallidurans* semblent capables de surproduire de polymères extracellulaires, riches en phosphore, pour y capturer le cadmium en excès, dans leur environnement. Ce dernier point n'a pas pu être validé dans notre étude et reste donc une perspective importante de notre travail. Le premier point en revanche a été confirmé par une mesure directe des concentrations de métaux retenus dans les 3 compartiments subcellulaires de nos deux bactéries modèles, par une approche de fractionnement physique des bactéries exposées aux métaux à des concentrations variables. En revanche, nos résultats n'ont pas été confirmés par approche de fractionnement chimique basée sur l'extraction spécifique avec un ligand organique fort (EDTA) des métaux retenus sur les membranes, approche qui s'est avérée peu fiable car très sensible aux conditions expérimentales.

Les résultats obtenus avec le recours à la méthode de fractionnement physique des cellules bactériennes (casse cellulaire à haute pression avec une presse de French) déjà largement validée par ailleurs et qui présente l'avantage de s'affranchir de l'utilisation de ligands organiques exogènes, sont en accord avec des études récentes, qui ont remis en question la conceptualisation classique, qui considère la membrane cellulaire comme le principal acteur de la biosorption des métaux. Cette conceptualisation considère que les substrats bactériens sont constitués de 3 ou 4 sites réactifs impliqués dans la réactivité cellulaire aux métaux. Dans une étude récente, par des calculs de réactivité théorique des différents constituants membranaires des bactéries à Gram-, Guiné et al. (2006) ont montré que l'adsorption des métaux sur les membranes bactériennes ne pouvait pas expliquer plus de 4 à 10% de la biosorption globale des métaux par les bactéries. Nos résultats sont donc en accord avec cette constatation et constituent une des premières preuves expérimentales



directes de la forte contribution du compartiment interne des cellules bactériennes à la bioaccumulation de métaux lourds tels que le zinc ou le cadmium.

Dans une perspective de transposition de ces résultats aux conditions environnementales, nous avons reproduit cette étude avec des cellules actives, c'est-à-dire qui se sont multipliées en présence de zinc ou de cadmium, seuls ou en mélanges. Les résultats ont montré un effet variable de la présence des deux métaux sur la croissance cellulaire bactérienne (taux de croissance) en fonction de leur concentration ou de leur mélange, mais surtout une modification profonde de la manière dont les cellules prennent en charge les métaux, probablement en relation avec la mise en place de systèmes d'efflux spécifiques ou de surproduction de constituants extrêmement réactifs (nanogranules de phosphore, ou EPS). Ainsi, lorsqu'on expose des cellules actives (cas de la grande majorité des bactéries de l'environnement) au zinc ou au cadmium, on observe une biosorption relative beaucoup plus faible de ces deux métaux par les bactéries (20 % max.) par rapport à des cellules inactivées à 4°C (jusqu'à 50% pour *C. metallidurans* CH34).

Ces résultats montrent ainsi, en particulier, que dans une optique de bioremédiation par biosorption des métaux, des cellules inactives (thermalisées par exemple) pourraient être plus efficaces que de cellules actives, capables de limiter activement l'effet toxique des métaux lourds en limitant leur bioaccumulation de métaux.

L'effet de la présence d'autres cations, et en particulier des métaux lourds, sur leur distribution subcellulaire a également été pris en compte en menant la même étude avec un mélange de cadmium et de zinc à la concentration la plus faible testée précédemment (pour des raisons de toxicité). Les résultats obtenus ont montré que l'exposition des cellules de *C. metallidurans* CH34 à un mélange de métaux ne modifie que faiblement la distribution subcellulaire du Cd et du Zn, contrairement à la biosorption globale des métaux, qui est réduite, notamment avec le Zn et *E. coli* K12DH5α. En effet, en présence de Cd les cellules de *E. coli* K12DH5α bioaccumulent beaucoup moins de Zn et réciproquement, la présence de Zn diminue la bioaccumulation de Cd. Ces résultats indiquent que chez *E. coli* K12DH5α le métabolisme du Cd semble être lié à celui du Zn (compétition ou induction des même systèmes de résistance, comme par exemple des transporteurs communs), alors que chez *C. metallidurans* CH34, la présence de Zn n'affecte pas la biosorption du Cd et inversement, indiquant des métabolismes différenciés pour ces deux métaux. Ceci est en accord avec diverses études sur cette bactérie qui ont confirmé que la régulation du Cd se fait principalement par des transporteurs de Ca, Mg et/ou Mn, c'est-à-dire indépendants de ceux du Zn. Au contraire, diverses études ont montré que chez *E. coli* K12DH5α, les métabolismes du Cd et du Zn sont fortement liés.

D'une manière générale, et même s'il existe des exceptions (Açikel and Alp, 2009), nos résultats sont plutôt en accord avec la littérature et montrent que la présence d'un métal compétiteur entraîne une diminution de la bioaccumulation métallique par rapport à une situation de monoexposition indiquant des effets de compétition pour les sites de sorption ou pour les mécanismes de résistance.

Pour finir, dans cette première partie, nous avons pu caractériser les propriétés thermodynamiques de réactivité des deux bactéries avec les deux métaux modèles, qu'ils soient seuls ou en mélange. Pour simplifier la suite de l'étude sur le transport facilité des métaux par les bactéries, nous avons choisi d'utiliser une modélisation assez classique et simplifiée considérant que la plupart des bactéries présentent une réactivité globale aux métaux assez proche et qui peut être assez bien représentée par une quantité discrète de sites réactifs (de 1 à 3). Nous n'avons donc pas intégré dans notre modélisation les différences de compartimentation subcellulaire des métaux, telles que nous venons de les décrire. Dans ce

souci de simplification, nous avons considéré d'une manière globale que ces sites réactifs peuvent être localisés sans distinction, sur les membranes ou dans le cytoplasme cellulaire.

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, sur le transport facilité des métaux par les bactéries, nous nous sommes tout d'abord intéressés au transport des bactéries dans un milieu poreux modèle, le sable d'Hostun HN34. Nous nous sommes placés dans des conditions défavorables à l'adhésion, soit à pH 6 et à faible force ionique (eau distillée), afin de favoriser au maximum la mobilité des cellules. Les résultats obtenus ont montré que les deux bactéries sont plutôt mobiles dans ce milieu mais sont quand même particulièrement retenues sur le sable malgré ces conditions défavorables au dépôt. *C. metallidurans* CH34 est ainsi moins mobile (40% de cellules sont retenues) que *E. coli* K12DH5α (10% de cellules retenues) en accord avec les résultats prédits par la théorie DLVO sur la base des propriétés de surface des deux bactéries (*C. metallidurans* CH34 est beaucoup moins électronégative que *E. coli* K12DH5α). Nos résultats ont montré que, dans nos conditions, les processus électrostatiques semblent plus être dominants sur les processus géométriques de filtration ou de straining, malgré que le sable d'Hostun présente une forte hétérogénéité de grains qui peut conduire à la formation de « régions immobiles » où les flux d'eau sont nuls et où les bactéries peuvent se retrouver piégées.

L'application de la cytométrie en flux au suivi de bactéries en milieu poreux a permis d'étudier la mobilité de bactéries depuis des faibles concentrations (difficilement mesurables autrement) jusqu'à de très fortes concentrations, et surtout l'effet mélange de bactéries sur leur transport réactif en milieu poreux.

Nos résultats ont montré que les deux bactéries sont sensibles à la concentration initiale d'injection mais à des niveaux variables. Ainsi, nous avons montré de manière originale que la rétention des deux bactéries (de manière beaucoup plus marquée pour *E. coli*) augmente avec l'augmentation de la concentration initiale en cellules, jusqu'à un certain seuil indiquant un effet de ripening, qui reste toutefois surprenant au vu de l'électronégativité des bactéries. En augmentant encore la concentration d'injection, cette rétention diminue, cette fois de manière plus classique, en suivant un mécanisme bien connu de type blocking, ou saturation des sites de rétention des bactéries. Ce type de résultat n'a été que très rarement observé pour les colloïdes, et en particulier pour les bactéries. Il a été observé récemment au laboratoire avec des nanoparticules minérales dans le même milieu poreux (Vitorge 2010).

L'étude du transport de bactéries en mélange a permis de montrer que la rétention des cellules de *C. metallidurans* CH34 est fortement augmentée en présence des cellules de *E. coli* K12DH5α qui, elles plus mobiles, ne semblent pas affectées par la présence de *C. metallidurans* CH34. Le peu d'études existantes sur le transport de mélange de bactéries ont montré que l'effet mélange était fortement dépendant des espèces considérées sans toutefois faire ressortir de mécanismes précis.

Dans une dernière phase de ce travail de thèse, nous avons montré que le sable utilisé est très réactif vis-à-vis des 2 métaux modèles qui sont très fortement retenus, « de manière irréversible » selon les conditions d'essais, en colonnes et élués seulement à fortes concentrations, c'est-à-dire dans des conditions où les sites de rétention des métaux sont saturés. Les deux métaux présentent des courbes de percée et des profils de rétention dans le sable très proches indiquant des mécanismes de rétention et de transport similaires. Nous avons également évalué l'aptitude des cellules bactériennes à faciliter et à accélérer la mobilisation des deux métaux, seuls ou en mélange. Pour cela, nous avons contaminé des colonnes de sable d'Hostun par injection de créneaux de Zn et/ou de Cd à forte concentration ( $10^{-4}$  ou  $5.10^{-4}$  M). Après rinçage des colonnes ainsi contaminées avec plusieurs volumes de pore d'eau déminéralisée jusqu'à concentration constante dans les effluents, nous avons

injecté un volume de pore de suspension de bactéries pour évaluer leur capacité de remobilisation des métaux. Les résultats ainsi obtenus ont permis de montrer un effet important des deux bactéries sur la mobilité du Zn et du Cd, qui dans tous les cas ont vu leur mobilité largement augmenter, que ce soit dans les effluents ou le long de la colonne de sable, avec dans certaines conditions le lessivage de plus de 50% des métaux initialement retenus dans le sable.

Ces effets de biolixiviation des métaux par les deux bactéries s'expliquent par la combinaison de deux processus distincts dont l'intensité varie d'une bactérie modèle à l'autre : 1/ un effet direct de facilitation du transfert des métaux biosorbés sur les cellules elles mêmes mobilisées, tel que nous l'avons vu dans le Chapitre IV, et 2/ un effet indirect des cellules sur la géochimie des métaux au contact des grains de sable qui induit une augmentation de solubilité et donc de mobilité (qui reste à confirmer). Cet effet correspond aux phénomènes de « bioweathering » ou biolixiviation, souvent expliqués par le relargage par la cellule de ligands organiques au contact des métaux, qui soit chélatent ces métaux et facilitent leur mobilisation, soit apportent des protons à la surface des grains de sable et favorisent ainsi la solubilisation des métaux.

L'étude du transport facilité de Cd et de Zn en mélange par chacune des deux bactéries a montré l'absence d'effet mélange, puisqu'aucun des deux métaux n'est transporté de manière préférentielle par rapport aux conditions de contamination monométallique, confirmant ainsi que les deux métaux sont sujets aux même processus de rétention, de transfert dissous mais aussi de transfert facilité par les bactéries.

A chaque étape de ce travail nous avons tenté de modéliser nos résultats expérimentaux pour tester nos hypothèses quant aux mécanismes de biosorption ou de transfert facilité observés. Pour cela nous avons appliqué une modélisation couplée hydrogéochimique à nos résultats expérimentaux, en considérant l'équation de convection – dispersion pour le transfert et le code PhreeQC pour la résolution des réactions d'interaction entre les métaux et les cellules ou le sable, et entre les cellules et le sable.

Les résultats obtenus en conditions statiques (biosorption des métaux) et dynamiques (transfert de bactéries seules et de métaux seuls ou en mélange) ont permis d'établir les propriétés thermodynamiques de réactivité du système ternaire métal/sable/bactéries qui nous ont ensuite servi à paramétrer le modèle couplé transfert-géochimie appliqué aux résultats de transfert des métaux dissous et biosorbés sur les bactéries. Sur cette base de modélisation nous avons pu ajuster correctement les courbes de lessivage des bactéries et des métaux et prédire les profils de rétention en colonnes de sable. Seuls les effets de *C. metallidurans* CH34 sur le transport des métaux à forte concentration n'ont pas pu être reproduits correctement avec les constantes de réactions déterminées à partir des études en batch, indiquant la dominance d'autres mécanismes par rapport à la biosorption, comme la modification de la géochimie du milieu par la production de ligands. Compte tenu de la complexité des mécanismes de transport facilité des métaux par les bactéries, et bien qu'encore imparfaite, car incomplète, cette approche de modélisation s'avère très prometteuse, si ce n'est pour prédire l'importance du transport des métaux associés aux biocolloïdes en milieux naturels, au moins pour tester des hypothèses sur des mécanismes précis, en laboratoire et pour faire avancer nos connaissances dans ce domaine.

Notre étude a donc permis de montrer que les bactéries représentent des biosorbants forts des métaux lourds tels que le Zn et le Cd, et qu'elles sont capables, au moins sous certaines conditions et de manière variable d'une bactérie à l'autre, d'augmenter et d'accélérer fortement le transport de ces métaux dans les milieux contaminés. Les résultats obtenus ouvrent donc des perspectives importantes autant en termes de bioremédiation des sols pollués que de compréhension et donc de prédiction du risque de contaminations des nappes par les bactéries et les métaux.

## **VI-2. Perspectives**

### **Biosorption des métaux pas les bactéries**

Concernant les analyses qualitatives de la distribution subcellulaire des métaux, il nous semble important de valider rapidement les résultats obtenus dans notre étude par des approches de microscopie électronique plus résolutive et plus sensible, telle que la Cryomicroscopie par exemple, qui permet de conserver en l'état les structures cellulaires sans ajout de contrastants ou de résines qui peuvent fausser les résultats, combinée à du PIXE ou du NanoSIMS pour une meilleure localisation subcellulaire des métaux. Des contacts ont été pris avec des spécialistes de ces techniques pour l'analyse de nos échantillons bactériens.

La technique de fractionnement physique des bactéries adaptée et appliquée dans cette étude a permis de caractériser de manière directe, efficace et, nous semble-t-il, robuste, la distribution subcellulaire du Cd et du Zn dans deux bactéries à Gram négatif. Il serait intéressant de poursuivre ces études avec d'autres bactéries, et notamment, des bactéries à Gram positif qui pourraient présenter des mécanismes différents de prise en charge des métaux. Cela permettrait ainsi de vérifier l'universalité des capacités de biosorption des bactéries généralement mise en avant dans la littérature. De même, il serait intéressant de réaliser des expériences avec une bactérie connue pour ses capacités de séquestration intracellulaire des métaux, ce qui permettrait de valider notre protocole d'étude avec un témoin que l'on peut qualifier de positif pour l'internalisation des métaux.

Pour mieux comprendre le rôle des EPS dans la protection des cellules vis-à-vis des métaux, l'utilisation de souches mutantes capables de surproduire ou au contraire de ne plus produire d'EPS ou d'autres constituants membranaires pourrait également apporter des connaissances nouvelles sur les mécanismes de biosorption des métaux par les bactéries.

De plus, dans l'environnement, les cellules étant le plus souvent sous forme de biofilms, la comparaison de la réactivité aux métaux de cellules libres (planctoniques) et de cellules en biofilms permettrait également de mieux comprendre les interactions métaux-constituants biotiques dans les milieux naturels terrestres ou aquatiques.

Enfin, se rapprocher des conditions environnementales en prenant en compte l'effet de la présence de ligands inorganiques et organiques (argiles, matière organique...) sur les mécanismes de biosorption des métaux devrait permettre de mieux comprendre comment les bactéries prennent en charge les métaux dans les sols naturels.

### **Transport facilité des métaux par les bactéries**

Les résultats obtenus ont montré le potentiel important de la Cytométrie en flux (CMF) pour l'étude du transport bactérien, en particulier en travaillant avec des souches génétiquement modifiées et marquées en fluorescence. La CMF permet de réaliser des quantifications bactériennes peu coûteuses (hors équipement), rapides, de forte sensibilité et de manière automatisée. Ces caractéristiques devraient permettre de tester de nombreuses conditions expérimentales, avec une large gamme de concentrations de bactéries ou de colloïdes marqués. De plus l'utilisation de bactéries fluorescentes permet de coupler ces analyses à de l'imagerie (microscopie confocale par exemple) afin de mieux comprendre les mécanismes de rétention des cellules bactériennes au niveau de la microporosité du milieu poreux. La CMF devrait également permettre d'étudier de manière plus précise le transport de mélanges de bactéries. Pour cela il faut encore améliorer la quantification des bactéries en sortie de colonnes, en utilisant des sondes fluorescentes ou en rendant les bactéries fluorescentes avec des marquages aux caractéristiques spectrales optimales (DsRed, CFP...). Une fois ces procédures au point, cette technique permettra d'étudier de nombreuses

conditions : effet de la concentration, créneaux successifs de bactéries différentes pour la bioremédiation...

Concernant l'étude du transport des bactéries, nos résultats ont montré que les propriétés physiques du milieu ainsi que les propriétés physico-chimiques de la solution semblaient être responsables de la rétention des cellules. Il serait intéressant de reproduire nos expériences à des forces ioniques différentes pour valider nos hypothèses de mécanismes de dépôt des cellules dans le sable d'Hostun, et en particulier des essais de remobilisation des cellules, après qu'elle aient été retenues, en jouant sur la force ionique de la solution, ce qui permettra également de confirmer le rôle de la géométrie porale du milieu.

Pour le transport facilité des métaux, il serait également intéressant de tester l'effet de l'injection de plusieurs créneaux successifs de bactéries ou d'échelons de bactéries ou encore en faisant varier la concentration cellulaire, pour mieux caractériser les mécanismes de remobilisation des métaux par ces bactéries, dans une perspective de développement de procédés de dépollution de milieux contaminés par des métaux lourds.

Comme pour la biosorption des métaux, il serait intéressant de se rapprocher des conditions naturelles en évaluant la capacité des bactéries à biolixivier des métaux retenus dans des sols naturels contaminés à forte dose.

Enfin, concernant la modélisation appliquée dans cette étude, il serait intéressant de tenter de l'améliorer en la couplant avec des modèles ou codes permettant de mieux décrire le transfert des biocolloïdes en milieu poreux, comme HYDRUS ou COMSOL. Ils sont capables de résoudre, au moins numériquement, des équations complexes de transfert réactif de colloïdes en 3 dimensions, approche utile pour évaluer les effets de géométrie du milieu poreux sur la mobilité des bactéries.

## **CHAPITRE VII Références bibliographiques**



- Açikel, Ü., Alp, T., 2009. A study on the inhibition kinetics of bioaccumulation of Cu(II) and Ni(II) ions using *Rhizopus delemar*. *Journal of Hazardous Materials* 168, 1449-1458.
- Auset, M., Keller, A.A., 2006. Pore-scale visualization of colloid straining and filtration in saturated porous media using micromodels. *Water Resour. Res.* 42, 1-9.
- Bai, H.J., Zhang, Z.M., Yang, G.E., Li, B.Z., 2008. Bioremediation of cadmium by growing *Rhodobacter sphaeroides*: Kinetic characteristic and mechanism studies. *Bioresource Technology* 99, 7716-7722.
- Beech, I.B., Cheung, C.W.S., 1995. Interactions of exopolymers produced by sulphate reducing bacteria with metal ions. *Int. Biodeter. Biodegrad* 35, 59-72.
- Bekhit, H.M., El-Kordy, M.A., Hassan, A.E., 2009. Contaminant transport in groundwater in the presence of colloids and bacteria: Model development and verification. *Journal of Contaminant Hydrology* 108, 152-167.
- Bergendahl, J.A., Grasso, D., 2003. Mechanistic basis for particle detachment from granular media. *Environ. Sci. Technol* 37, 2317-2322.
- Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H.U., Egli, T., 2007. Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3283-3290.
- Beveridge, T.J., 1989. Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. *Annual review of microbiology* 43, 147-171.
- Bhaskar, P.V., Bhosle, N.B., 2006. Bacterial extracellular polymeric substances (EPS): a carrier of heavy metals in the marine food chains. *Environment International* 32, 191-198.
- Bisson, M., Diderich, R., Hulot, C., Houeix, N., Lacroix, G., Lefevre, J.P., Magaud, H., Morin, A., 2005. Zinc et ses dérivés (INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques No. INERIS –DRC-01-25590-00DF259.doc). INERIS.
- Blencowe, D.K., Morby, A.P., 2003. Zn(II) metabolism in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 291-311.
- Bradford, S., Bettahar, M., 2006. Concentration dependent transport of colloids in saturated porous media. *Journal of Contaminant Hydrology* 82, 99-117.
- Bradford, S.A., Bettahar, M., 2005. Straining, attachment, and detachment of cryptosporidium oocysts in saturated porous media. *J. Environ. Qual* 34, 469-478.
- Bradford, S.A., Kim, H.N., Haznedaroglu, B.Z., Torkzaban, S., Walker, S.L., 2009. Coupled Factors Influencing Concentration-Dependent Colloid Transport and Retention in Saturated Porous Media. *Environ. Sci. Technol.* 43, 6996-7002.
- Bradford, S.A., Simunek, J., Bettahar, M., van Genuchten, M.T., Yates, S.R., 2003. Modeling Colloid Attachment, Straining, and Exclusion in Saturated Porous Media. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2242-2250.
- Brignon, J.M., Malherbe, L., 2005. Cadmium et ses dérivés (INERIS- Données technico-économique sur les substances chimiques en France).
- Bruins, M., Kapil, M., Oehme, F.W., 2000. Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45, 198-207.
- Bunge, M., Søbberg, L.S., Rotaru, A.E., Gauthier, D., Lindhardt, A.T., Hause, G., Finster, K., Kingshott, P., Skrydstrup, T., Meyer, R.L., 2010. Formation of palladium(0) nanoparticles at microbial surfaces. *Biotechnol. Bioeng.* 107, 206-215.



- Camesano, T.A., 1999. Blocking and ripening of colloids in porous media and their implications for bacterial transport. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 160, 291-307.
- Camesano, T.A., Logan, B.E., 1998. Influence of Fluid Velocity and Cell Concentration on the Transport of Motile and Nonmotile Bacteria in Porous Media. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1699-1708.
- Campbell, P., Errecalde, O., Fortin, C., Hiriartbaer, V., Vigneault, B., 2002. Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133, 189-206.
- Chang, J., 1997. Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Research* 31, 1651-1658.
- Characklis, W., Wilderer, K.C., 1989. Structure and function of biofilms. In: W.G. Characklis and P.A. Wilderer ed. Wiley, Chichester.
- Chen, J.H., Lion, L.W., Ghiorse, W.C., Shuler, M.L., 1995. Mobilization of adsorbed cadmium and lead in aquifer material by bacterial extracellular polymers. *Water Research* 29, 421-430.
- Choi, J., Park, J.W., 2005. Competitive adsorption of heavy metals and uranium on soil constituents and microorganism. *Geosciences Journal* 9, 53-61.
- Citeau, L., Lamy, I., van Oort, F., Elsass, L., 2003. Colloidal facilitated transfer of metals in soils under different land use. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 217, 11-19.
- Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M., 2006a. Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: Soluble or bound. *Process Biochemistry* 41, 815-823.
- Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M., 2006b. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme and Microbial Technology* 38, 237-245.
- Cox, J.S., Smith, D.S., Warren, L.A., Ferris, F.G., 1999. Characterizing Heterogeneous Bacterial Surface Functional Groups Using Discrete Affinity Spectra for Proton Binding. *Environ. Sci. Technol.* 33, 4514-4521.
- Cumbie, D.H., McKay, L.D., 1999. Influence of diameter on particle transport in a fractured shale saprolite. *Journal of Contaminant Hydrology* 37, 139-157.
- Denaix, L., Semlali, R.M., Douay, F., 2001. Dissolved and colloidal transport of Cd, Pb, and Zn in a silt loam soil affected by atmospheric industrial deposition. *Environ. Pollut* 114, 29-38.
- Dong, H., Rothmel, R., Onstott, T.C., Fuller, M.E., DeFlaun, M.F., Streger, S.H., Dunlap, R., Fletcher, M., 2002. Simultaneous Transport of Two Bacterial Strains in Intact Cores from Oyster, Virginia: Biological Effects and Numerical Modeling. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2120-2132.
- Ehrlich, H.L., 1997. Microbes and metals. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48, 687-692.
- Elimelech, M., O'Melia, C.R., 1990. Effect of electrolyte type on the electrophoretic mobility of polystyrene latex colloids. *Colloids and Surfaces* 44, 165-178.
- Fein, J., Daughney, C., Yee, N., Davis, T., 1997. A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61, 3319-3328.

- Février, L., 2001. Transfert d'un mélange Zn-Cd-Pb dans un dépôt fluvio-glaciaire carbonaté. Approche en colonnes de laboratoire. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.
- Finlay, J.A., Allan, V.J., Conner, A., Callow, M.E., Basnakova, G., Macaskie, L.E., 1999. Phosphate release and heavy metal accumulation by biofilm-immobilized and chemically-coupled cells of a *Citrobacter* sp. pre-grown in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng* 63, 87-97.
- Fontes, D.E., Mills, A.L., Hornberger, G.M., Herman, J.S., 1991. Physical and chemical factors influencing transport of microorganisms through porous media. *Appl. Environ. Microbiol* 57, 2473-2481.
- Foppen, J.W., van Herwerden, M., Schijven, J., 2007. Measuring and modelling straining of *Escherichia coli* in saturated porous media. *J. Contam. Hydrol* 93, 236-254.
- Foppen, J.W., Mporokoso, A., Schijven, J., 2005. Determining straining of from breakthrough curves. *Journal of Contaminant Hydrology* 76, 191-210.
- Foppen, J.W., Schijven, J.F., 2006. Evaluation of data from the literature on the transport and survival of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in aquifers under saturated conditions. *Water Res* 40, 401-426.
- Gadd, G.M., 2009. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156, 609-643.
- Gadd, G.M., 1992. Metals and microorganisms: a problem of definition. *FEMS Microbiol. Lett* 79, 197-203.
- Gadd, G.M., 2000. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr Opin Biotechnol* 11, 271-9.
- Gargiulo, G., Bradford, S.A., Simunek, J., Ustohal, P., Vereecken, H., Klumpp, E., 2007. Transport and deposition of metabolically active and stationary phase *Deinococcus radiodurans* in unsaturated porous media. *Environ. Sci. Technol* 41, 1265-1271.
- Gaudet, J.-P., Vauclin, M., 2005. Rétention et transfert des pollutions des sols par les éléments traces-métaux lourds : mécanismes et modélisation numérique, dans: *Géomécanique environnementales sols pollués et déchets*. Hermes - Lavoisier, p. 249.
- Geesey, G.G., 1982. Microbial exopolymers: Ecological and economic considerations. *Am. Soc. Microbiol. News* 48, 9-14.
- Gelabert, A., Pokrovsky, O., Viers, J., Schott, J., Boudou, A., Feurtetmazel, A., 2006. Interaction between zinc and freshwater and marine diatom species: Surface complexation and Zn isotope fractionation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, 839-857.
- Gilmour, C., Riedel, G., 2009. Biogeochemistry of Trace Metals and Metalloids, dans: *Encyclopedia of Inland Waters*. Elsevier, p. 7-15.
- Ginn, T.R., Wood, B.D., Nelson, K.E., Scheibe, T.D., Murphy, E.M., Clement, T.P., 2002. Processes in microbial transport in the natural subsurface. *Advances in Water Resources* 25, 1017-1042.
- Grolimund, D., Barmettler, K., Borkovec, M., 2001. Release and transport of colloidal particles in natural porous media: 2. Experimental results and effects of ligands. *Water Resour. Res.* 37, 571.
- Grolimund, D., Elimelech, M., Borkovec, M., Barmettler, K., Kretzschmar, R., Sticher, H., 1998. Transport of in Situ Mobilized Colloidal Particles in Packed Soil Columns. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3562-3569.

- Guibaud, G., 2003. Relation between extracellular polymers' composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere* 52, 1701-1710.
- Guibaud, G., Comte, S., Bordas, F., Dupuy, S., Baudu, M., 2005. Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produces by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel. *Chemosphere* 59, 629-638.
- Guiné V., Martins, J., Gaudet J.P., 2003. Facilitated transport of heavy metals by bacterial colloids in sand columns. *Journl de Physique IV* 107; 593-596.
- Guiné, V., 2006. Approche expérimentale et théorique de la réactivité de surface et de la mobilité des colloïdes bactériens en milieux poreux. Institut National Polytechnique de grenoble.
- Guine, V., Martins, J., Causse, B., Durand, A., Gaudet, J., Spadini, L., 2007. Effect of cultivation and experimental conditions on the surface reactivity of the metal-resistant bacteria *Cupriavidus metallidurans* CH34 to protons, cadmium and zinc. *Chemical Geology* 236, 266-280.
- Guiné, V., Spadini, L., Sarret, G., Muris, M., Delolme, C., Gaudet, J.-P., Martins, J.M.F., 2006. Zinc Sorption to Three Gram-Negative Bacteria: Combined Titration, Modeling, and EXAFS Study. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1806-1813.
- Ha, J., Gélabert, A., Spormann, A.M., Brown Jr., G.E., 2010. Role of extracellular polymeric substances in metal ion complexation on *Shewanella oneidensis*: Batch uptake, thermodynamic modeling, ATR-FTIR, and EXAFS study. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 1-15.
- Haferburg, G., Kothe, E., 2007. Microbes and metals: interactions in the environment. *J. Basic Microbiol.* 47, 453-467.
- Hao, Z., Reiske, H.R., Wilson, D.B., 1999. Characterization of cadmium uptake in *Lactobacillus plantarum* and isolation of cadmium and manganese uptake mutants. *Appl. Environ. Microbiol* 65, 4741-4745.
- Hassler, C.S., Slaveykova, V.I., Wilkinson, K.J., 2004. Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnology and Oceanography: Methods* 237-247.
- Haznedaroglu, B.Z., Kim, H.N., Bradford, S.A., Walker, S.L., 2009. Relative Transport Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Serovar Pullorum in Packed Bed Column Systems: Influence of Solution Chemistry and Cell Concentration. *Environ. Sci. Technol.* 43, 1838-1844.
- Hermansson, M., 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14, 105-119.
- Iyer, A., Mody, K., Jha, B., 2004. Accumulation of hexavalent chromium by an exopolysaccharide producing marine *Enterobacter cloacae*. *Mar. Pollut. Bull.* 49.
- Jacobs, A., 2007. Transport bactérien en milieux poreux: expérimentations et modélisation. Migration de bactéries issues de boues de STEP. Université d'Avignon.
- Jacobs, A., Lafolie, F., Herry, J., Debroux, M., 2007. Kinetic adhesion of bacterial cells to sand: Cell surface properties and adhesion rate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 59, 35-45.
- Jansen, S., Vereecken, H., Klumpp, E., 2010. On the role of metabolic activity on the transport und deposition of *Pseudomonas fluorescens* in saturated porous media. *Water Research* 44, 1288-1296.

- Jerez, C.A., 2009. Metal Extraction and Biomining, dans: Encyclopedia of Microbiology. Elsevier, p. 407-420.
- Jocteur Monrozier, L., Guez, P., Chalamet, A., Bardin, R., Martins, J., Gaudet, J.P., 1993. Distribution of microorganisms and fate of xenobiotic molecules in unsaturated soil environments. Science of The Total Environment 136, 121-133.
- Johnson, K.J., Ams, D.A., Wedel, A.N., Szymanowski, J.E.S., Weber, D.L., Schneegurt, M.A., Fein, J.B., 2007. The impact of metabolic state on Cd adsorption onto bacterial cells. Geobiology 5, 211-218.
- Johnson, W.P., Li, X., Yal, G., 2007. Colloid Retention in Porous Media: Mechanistic Confirmation of Wedging and Retention in Zones of Flow Stagnation. Environ. Sci. Technol. 41, 1279-1287.
- Karathanasis, A.D., 1995. Subsurface Migration of Copper and Zinc Mediated by Soil Colloids. Soil science Society of America journal 63, 830-838.
- Karathanasis, A.D., Johnson, D.M.C., Matocha, C.J., 2005. Biosolid Colloid-Mediated Transport of Copper, Zinc, and Lead in Waste-Amended Soils. Journal of Environment Quality 34, 1153.
- Kassab, D.M., Roane, T.M., 2006. Differential responses of a mine tailings *Pseudomonas* isolate to cadmium and lead exposures. Biodegradation 17, 379-387.
- Kazy, S.K., Sar, P., Singh, S.P., Sen, A.K., D'Souza, S.F., 2002. Extracellular polysaccharides of a copper-sensitive and copper-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain: synthesis, chemical nature and copper binding. World J. Microbiol. Biotechnol. 18, 583-588.
- Keasling, J.D., Van Dien, S.J., Pramanik, J., 1998. Engineering polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*: implications for bioremediation of inorganic contaminants. Biotechnol. Bioeng 58, 231-239.
- Keller, C., Domergue, F.L., 1996. Soluble and particulate transfers of Cu, Cd, Al, Fe and some major elements in gravitational waters of a Podzol. Geoderma 71, 263-274.
- Kelly, S.D., Boyanov, M.I., Bunker, B.A., Fein, J.B., Fowle, D.A., Yee, N., Kemner, K.M., 2001. XAFS determination of the bacterial cell wall functional groups responsible for complexation of Cd and U as a function of pH. J Synchrotron Rad 8, 946-948.
- Kemper, M.A., Urrutia Mera, M., Beveridge, T.J., Koch, A.L., Doyle, R.J., 1993. Proton motive force may regulate cell wall-associated enzymes of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 175, 5690-5696.
- Kenney, J.P.L., Fein, J.B., 2011. Importance of extracellular polysaccharides on proton and Cd binding to bacterial biomass: A comparative study. Chemical Geology.
- Kim, H.N., Bradford, S.A., Walker, S.L., 2009. *Escherichia coli* O157:H7 Transport in Saturated Porous Media: Role of Solution Chemistry and Surface Macromolecules. Environ. Sci. Technol. 43, 4340-4347.
- Kim, S.Y., Kim, J.H., Kim, C.H., Oh, D.K., 1996. Metal adsorption of the polysaccharide produced from *Methylobacterium organophilum*. Biotechnol. Lett. 18, 1161-1164.
- Kretzschmar, R., Schäfer, T., 2005. Metal retention and transport on colloidal particles in the environment. Elements 1, 205-210.
- Kretzschmar, R., Borkovec, M., Grolimund, D., Elimelech, M., 1999. Mobile Subsurface Colloids and Their Role in Contaminant Transport, dans: Advances in Agronomy. Elsevier, p. 121-193.
- Kretzschmar, R., Sticher, H., 1998. Colloid transport in natural porous media: influence of surface chemistry and flow velocity. Physics and Chemistry of The Earth 23, 133-139.

- Laddaga, R.A., Silver, S., 1985. Cadmium uptake in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 162, 1100-1105.
- Ledin, M., 2000. Accumulation of metals by microorganisms — processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews* 51, 1-31.
- Leive, L., 1965. Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 21, 290-296.
- Li, Q., Wu, S., Liao, X., Deng, X., Sun, D., Hu, Y., Huang, Y., 2004. Simultaneous biosorption of cadmium (II) and lead (II) ions by pretreated biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. *Separation and Purification Technology* 34, 135-142.
- Lloyd, J.R., Lovley, D.R., Macaskie, L.E., 2003. Biotechnological application of metal-reducing microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol* 53, 85-128.
- Loaëc, M., Olier, R., Guezennec, J., 1997. Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water. Res.* 31, 1171-1179.
- Lovley, D.R., Lloyd, J.R., 2000. Microbes with a mettle for bioremediation. *Nat. Biotechnol* 18, 600-601.
- Lowry, O.H., Rosebrough, A.L.W., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 265-275.
- Malik, A., 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International* 30, 261-278.
- Marquardt, D.W., 1963. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. *SIAM J. Appl. Math.* 11, 431.
- Martin, T.A., Ruby, M.V., 2004. Review of in situ remediation technologies for lead, zinc, and cadmium in soil. *Remediation* 14, 35-53.
- Martins, J., Jocteur Monrozier, Chalamet, A., Bardin, R., 1997. Microbial response to repeated applications of low concentrations of pentachlorophenol in an alfisol under pasture. *Chemosphere* 35, 1637-1650.
- Martins, J., 2008. Microbiogéochimie, transfert réactif et impact des micropolluants dans les sols. Approche couplée multi-échelles et modélisation. (Synthèse des travaux de recherche en vue de l'obtention de l'habilitation à diriger des recherches). Université Joseph Fourier - Grenoble I.
- Martins, J.M.F., Mermoud, A., 1999. Transport of rimsulfuron and its metabolites in soil columns. *Chemosphere* 38, 601-616.
- Martins, J.M.F., 1989. Etude de la régulation de l'expression des gènes *excC* et *excD* impliqués dans l'excrétion de protéines periplasmiques chez *Escherichia coli* et analyse de la compartimentation de leurs produits au sein de l'enveloppe cellulaire. Université Claude Bernard Lyon1.
- Martins, J.M.F., Mermoud, A., 1998. Sorption and degradation of four nitroaromatic herbicides in mono and multi-solute saturated/unsaturated soil batch systems. *Journal of Contaminant Hydrology* 33, 187-210.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Shin-Ichiro, M., Lee, Y.C., 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry* 339, 69-72.
- Matsunaga, T., 1999. Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. *Journal of Biotechnology* 70, 33-38.
- Maynadié, M., 2006. La cytométrie en flux. Editions Tec & Doc, Paris.

- McCarthy, J.F., Zachara, J.M., 1989. Subsurface transport of contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 23, 496-502.
- Meinders, J., 1995. Deposition Efficiency and Reversibility of Bacterial Adhesion under Flow. *Journal of Colloid and Interface Science* 176, 329-341.
- Mergeay, M., Nies, D.H., Schlegel, H.G., Charles, P., Gerits, J., 1987. *A. eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metal. *J. Bact.* 162, 328-334.
- Mills, W.B., Liu, S., Fong, F.K., 1991. Literature Review and Model (COMET) for Colloid/Metals Transport in Porous Media. *Ground Water* 29, 199-208.
- Miquel, G., 2001. Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé (Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques). Assemblée nationale.
- Mirimanoff, N., Wilkinson, K.J., 2000. Regulation of Zn Accumulation by a Freshwater Gram-Positive Bacterium (*Rhodococcus opacus*). *Environ. Sci. Technol.* 34, 616-622.
- Mishra, B., Boyanov, M.I., Bunker, B.A., Kelly, S.D., Kemner, K.M., Nerenberg, R., Read-Daily, B.L., Fein, J.B., 2009. An X-ray absorption spectroscopy study of Cd binding onto bacterial consortia. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73, 4311-4325.
- Monchy, S., Benotmane, M.A., Janssen, P., Vallaey, T., Taghavi, S., van der Lelie, D., Mergeay, M., 2007. Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* Are Specialized in the Maximal Viable Response to Heavy Metals. *Journal of Bacteriology* 189, 7417-7425.
- Morillo Pérez, J.A., García-Ribera, R., Quesada, T., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sánchez, M., 2008. Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*. *World J Microbiol Biotechnol* 24, 2699-2704.
- Muris, M., 2004. Caractérisation du transport colloïdal du zinc en milieu sableux. Université Joseph Fourier, Grenoble.
- Musy, A., Soutter, M., 1991. *Physique du sol*. Presse Polytechniques Universitaires Romandes, Lausanne.
- Ngwenya, B., Sutherland, I.W., Kennedy, L., 2003. Comparison of the acid-base behaviour and metal adsorption characteristics of a gram-negative bacterium with other strains. *Applied Geochemistry* 18, 527-538.
- Nies, D.H., 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 51, 730-750.
- Nies, D.H., 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 313-339.
- Nies, D.H., Silver, S., 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind. Microbiol* 14, 186-199.
- Nocito-gobel, Tobiason, J.E., 1996. Effects of ionic strength on colloid deposition and release. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 107, 223-231.
- Okamura, H., Aoyama, I., 1994. Interactive toxic effect and distribution of heavy metals in phytoplankton. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 9, 7-15.
- Oliver, D., Heathwaite, A., Hodgson, C., Chadwick, D., 2007. Mitigation and Current Management Attempts to Limit Pathogen Survival and Movement Within Farmed Grassland, dans: *Advances in Agronomy*. Elsevier, p. 95-152.

- Oliver, D.M., Haygarth, P.M., Clegg, C.D., Heathwaite, A.L., 2006. Differential *E. coli* Die-Off Patterns Associated with Agricultural Matrices. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5710-5716.
- Otto, K., Elwing, H., Hermansson, M., 1999. The role of type 1 fimbriae in adhesion of *Escherichia coli* to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 15, 99-111.
- Ozdemir, G., Ceyhan, N., Manav, E., 2005. Utilization of an exopolysaccharide produced by TEM05 in alginate beads for adsorption of cadmium and cobalt ions. *Bioresource Technology* 96, 1677-1682.
- Pabst, M.W., Miller, C.D., Dimkpa, C.O., Anderson, A.J., McLean, J.E., 2010. Defining the surface adsorption and internalization of copper and cadmium in a soil bacterium, *Pseudomonas putida*. *Chemosphere* 81, 904-910.
- Pachepsky, Y., Sadeghi, A., Bradford, S., Shelton, D., Guber, A., Dao, T., 2006. Transport and fate of manure-borne pathogens: Modeling perspective. *Agricultural Water Management* 86, 81-92.
- Pagès, D., Sanchez, L., Conrod, S., Gidrol, X., Fekete, A., Schmitt-Kopplin, P., Heulin, T., Achouak, W., 2007. Exploration of intracolonial adaptation mechanisms of *Pseudomonas brassicacearum* facing cadmium toxicity. *Environ Microbiol* 9, 2820-2835.
- Pal, A., Paul, A.K., 2008. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian J Microbiol* 48, 49-64.
- Pang, L., Close, M.E., Noonan, M.J., Flintoft, M.J., van den Brink, P., 2005. A Laboratory Study of Bacteria-Facilitated Cadmium Transport in Alluvial Gravel Aquifer Media. *Journal of Environment Quality* 34, 237.
- Pardo, R., Herguedas, M., Barrado, E., Vega, M., 2003. Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas Putida*. *Anal Bioanal Chem* 376, 26-32.
- Park, S.-J., Kim, S.-B., Kim, K.-W., 2010. Analysis of bacterial cell properties and transport in porous media. *J. of Env. Sc. & Hlth., Part A* 45, 682-691.
- Parthasarathy, N., Pelletier, M., Buffle, J., 1997. Hollow fiber based supported liquid membrane: a novel analytical system for trace metal analysis. *Analytica Chimica Acta* 350, 183-195.
- Pédrot, M., Dia, A., Davranche, M., Bouhnik-Le Coz, M., Henin, O., Gruau, G., 2008. Insights into colloid-mediated trace element release at the soil/water interface. *Journal of Colloid and Interface Science* 325, 187-197.
- Pérez-Rama, M., Alonso, J.A., López, C.H., Vaamonde, E.T., 2002. Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Bioresour. Technol* 84, 265-270.
- Plette, A.C., Benedetti, M.F., van Riemsdijk, W.H., 1996. Competitive Binding of Protons, Calcium, Cadmium, and Zinc to Isolated Cell Walls of a Gram-Positive Soil Bacterium. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1902-1910.
- Prado Acosta, M., Valdman, E., Leite, S.G.F., Battaglini, F., Ruzal, S.M., 2005. Biosorption of Copper by *Paenibacillus polymyxa* Cells and their Exopolysaccharide. *World J Microbiol Biotechnol* 21, 1157-1163.
- Redman, J.A., Walker, S.L., Elimelech, M., 2004. Bacterial Adhesion and Transport in Porous Media: Role of the Secondary Energy Minimum. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1777-1785.

- Rijnaarts, H., 1995. The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 4, 191-197.
- Roane, T.M., Josephson, K.L., Pepper, I.L., 2001. Dual-Bioaugmentation Strategy To Enhance Remediation of Cocontaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3208-3215.
- Roux, M., Sarret, G., Pignot-Paintrand, I., Fontecave, M., Coves, J., 2001. Mobilization of Selenite by *Ralstonia metallidurans* CH34. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 769-773.
- Roy, S.B., Dzombak, D.A., 1997. Chemical Factors Influencing Colloid-Facilitated Transport of Contaminants in Porous Media. *Environ. Sci. Technol.* 31, 656-664.
- Rozycki, T., Nies, D.H., 2008. *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie van Leeuwenhoek* 96, 115-139.
- Ryan, J., Elimelech, M., 1996. Colloid mobilization and transport in groundwater. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 107, 1-56.
- Saier, M.H., Tam, R., Reizer, A., Reizer, J., 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol* 11, 841-847.
- Saiers, J.E., Hornberger, G.M., 1999. The influence of ionic strength on the facilitated transport of cesium by kaolinite colloids. *Water Resour. Res.* 35, 1713.
- Sarret, G., Avoscan, L., Carriere, M., Collins, R., Geoffroy, N., Carrot, F., Coves, J., Gouget, B., 2005. Chemical Forms of Selenium in the Metal-Resistant Bacterium *Ralstonia metallidurans* CH34 Exposed to Selenite and Selenate. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2331-2337.
- Schweich, D., Sardin, M., 1981. Adsorption, partition, ion exchange and chemical reaction in batch reactors or in columns — A review. *Journal of Hydrology* 50, 1-33.
- Sen, T.K., Das, D., Khilar, K., Suraishkumar, G., 2005. Bacterial transport in porous media: New aspects of the mathematical model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 260, 53-62.
- Sen, T.K., Khilar, K., 2006. Review on subsurface colloids and colloid-associated contaminant transport in saturated porous media. *Adv. Colloid Interface Sci* 119, 71-96.
- Sen, T.K., Mahajan, S.P., Khilar, K.C., 2002. Colloid-Associated contaminant transport in porous media: 1. Experimental studies. *AIChE J.* 48, 2366-2374.
- Sharma, M.M., Chang, Y.I., Yen, T.F., 1985. Reversible and irreversible surface charge modification of bacteria for facilitating transport through porous media. *Colloids and Surfaces* 16, 193-206.
- Shi, L., Günther, S., Hübschmann, T., Wick, L.Y., Harms, H., Müller, S., 2007. Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytometry* 71A, 592-598.
- Sigg, L., Behra, P., Stumm, W., 2001. *Chimie des milieux aquatiques chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement*, 3<sup>e</sup> ed. Dunod, Paris.
- Sigg, L., Behra, R., 2005. Speciation and bioavailability of trace metals in freshwater environments. *Met Ions Biol Syst* 44, 47-73.
- Silver, S., Phung, L.T., 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J IND MICROBIOL BIOTECHNOL* 32, 587-605.



- Simunek, J., van Genuchten, M.T., Sejna, M., Leiji, F.J., 1999. The STANMOD Computer Software for Evaluating Solute Transport in Porous Media Using Analytical Solutions of Convection-Dispersion Equation, Versions 1.0 and 2.0. (IGWMC-TPS-71 ed. Int. Ground Water Modeling Ctr, Colorado School of Mines, Golden.).
- Slaveykova, V.I., Dedieu, K., Parthasarathy, N., Hajdu, R., 2009. Effect of competing ions and complexing organic substances on the cadmium uptake by the soil bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Environ Toxicol Chem* 28, 741.
- Smiejan, A., Wilkinson, K.J., Rossier, C., 2003. Cd Bioaccumulation by a Freshwater Bacterium, *Rhodospirillum rubrum*. *Environ. Sci. Technol.* 37, 701-706.
- Song, L., Johnson, P.R., Elimelech, M., 1994. Kinetics of Colloid Deposition onto Heterogeneously Charged Surfaces in Porous Media. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1164-1171.
- Soupir, M.L., Mostaghimi, S., 2010. *Escherichia coli* and Enterococci Attachment to Particles in Runoff from Highly and Sparsely Vegetated Grassland. *Water Air Soil Pollut* 216, 167-178.
- Stevik, T.K., Aa, K., Ausland, G., Hanssen, J.F., 2004. Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: a review. *Water Research* 38, 1355-1367.
- Sträuber, H., Müller, S., 2010. Viability states of bacteria-Specific mechanisms of selected probes. *Cytometry* 77A, 623-634.
- Stump, C., Lawrence, J.R., Hendry, M.J., Maloszewski, P., 2011. Transport and Bacterial Interactions of Three Bacterial Strains in Saturated Column Experiments. *Environ. Sci. Technol.* 45, 2116-2123.
- Toride, N., Leiji, F.J., van Genuchten, M.T., 1999. The CXTFIT Code for estimating transport parameters from laboratory fields tracer experiments Version 2.1 (U.S. Salinity Laboratory, riverside, CA).
- Torkzaban, S., Tazehkand, S.S., Walker, S.L., Bradford, S.A., 2008. Transport and fate of bacteria in porous media: Coupled effects of chemical conditions and pore space geometry. *Water Resour. Res.* 44.
- Truesdail, S., Lukasik, J., Farrah, S.R., Shah, D.O., Dickinson, R.B., 1998. Analysis of Bacterial Deposition on Metal (Hydr)oxide-Coated Sand Filter Media. *Journal of Colloid and Interface Science* 203, 369-378.
- Tunali, S., Cabuk, A., Akar, T., 2006. Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. *Chemical Engineering Journal* 115, 203-211.
- Ueshima, M., Ginn, B., Haack, E., Szymanowski, J., Fein, J., 2008. Cd adsorption onto *Pseudomonas putida* in the presence and absence of extracellular polymeric substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 5885-5895.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Frey-Klett, P., 2009. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends Microbiol* 17, 378-387.
- Urrutia Mera, M., Kemper, M., Doyle, R., Beveridge, T.J., 1992. The membrane-induced proton motive force influences the metal binding ability of *Bacillus subtilis* cell walls. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3837-3844.
- Vaara, M., 1992. Agents That Increase the Permeability of the Outer Membrane. *Microbiological Reviews* 395-411.

- Vitorge, E., 2010. Developpement et utilisation de nanotraceurs pour l'étude du transport de colloïdes en milieux poreux. Expérimentations et modélisations. Université de Grenoble.
- Watt, R.K., Ludden, P.W., 1999. Ni(2+) transport and accumulation in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol* 181, 4554-4560.
- Wingender, J., 1999. Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function. Springer, Berlin; New York.
- Worms, I., Simon, D.F., Hassler, C.S., Wilkinson, K.J., 2006. Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. *Biochimie* 88, 1721-1731.
- Yee, N., Fein, J., 2001. Cd adsorption onto bacterial surfaces: a universal adsorption edge? *Geochem. Cosmochem. Acta* 65, 2037-2042.
- Yee, N., Fein, J.B., 2002. Does metal adsorption onto bacterial surfaces inhibit or enhance aqueous metal transport? Column and batch reactor experiments on Cd–*Bacillus subtilis*–quartz systems. *Chemical Geology* 185, 303-319.
- Yin, X., Gao, B., Ma, L.Q., Saha, U.K., Sun, H., Wang, G., 2010. Colloid-facilitated Pb transport in two shooting-range soils in Florida. *Journal of Hazardous Materials* 177, 620-625.



## **ANNEXES**



## **ANNEXE 1 : Enumération des cellules bactériennes par Cytométrie en Flux (CMF)**

### **Généralités sur la CMF**

Le laboratoire dispose d'un cytomètre en flux (CMF) C6 de Accuri (Figure 1), qui nous a permis d'effectuer un suivi rapide de la croissance cellulaire et également d'évaluer la toxicité du Zn et du Cd sur les bactéries modèles.



**Figure 1: Photographie du cytomètre en flux C6 de Accuri avec passeur d'échantillon.**

La cytométrie en flux peut être définie comme l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs:

- aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à leur structure interne, ou à l'auto fluorescence de certaines cellules (végétaux par exemple).
- aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés et traités. Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (1 paramètre) ou de cytogrammes (2 paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées (figure III-3). Afin d'être analysées, les cellules doivent être mises en suspension. Les cellules sont amenées au centre d'une buse de mesure et alignées les unes derrière les autres (centrage hydrodynamique) afin d'être excitées une par une avec le faisceau

lumineux. Pour cela, le liquide dans lequel se fait la mesure (liquide de gaine) subit une accélération progressive ce qui entraîne un étirement de l'échantillon liquide et ainsi aligne les cellules au centre du jet.

Les sources d'excitation utilisées dans le cytomètre C6 d'Accuri sont des lasers qui présentent un grand nombre d'avantages: puissance, stabilité, finesse du faisceau. La présence de 4 lasers de longueur d'ondes caractéristiques différentes permet de multiplier le nombre de fluorochromes aux caractéristiques spectrales différentes (Tableau 1) utilisables pour marquer spécifiquement des populations bactériennes, ce qui est particulièrement intéressant pour les mélanges de populations.

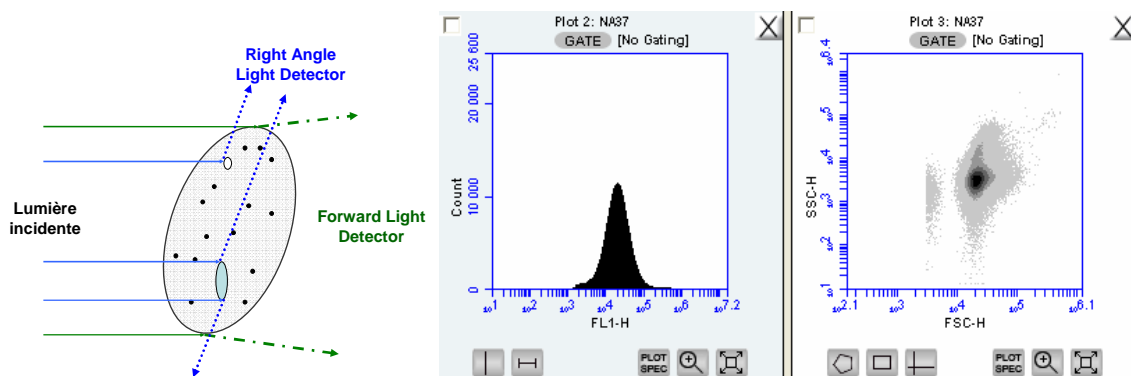
**Tableau VIII1 : Longueurs d'ondes caractéristiques des lasers du cytomètre C6 de Accuri.**

	Nom du laser	Longueur d'onde d'excitation	Longueur d'onde d'émission
<b>Laser bleu</b>	FL1	488 nm	530 $\pm$ 15nm
	FL2	488 nm	585 $\pm$ 20nm
	FL3	488nm	> 670nm
<b>Laser rouge</b>	FL4	640 nm	675 $\pm$ 15nm

Une fois excitée par le laser, la cellule bactérienne ré-émet les différents signaux optiques qui doivent être focalisés, séparés, puis acheminés vers des systèmes de détection, les photomultiplicateurs. Ils sont pour cela, sélectionnés par différents circuits optiques, composés d'une alternance de miroirs et de filtres. Après avoir traversé cette succession de miroirs et de filtres, la lumière est recueillie et transformée en signal électrique par un photomultiplicateur. Les signaux optiques recueillis ont une intensité corrélée avec des propriétés cellulaires : **la lumière diffusée** renseigne sur la morphologie et la structure de la cellule. Si la diffusion de la lumière est mesurée dans l'axe du rayon incident, l'intensité du signal peut être corrélée avec la taille et la viabilité cellulaire. Sous un angle de 90°, la mesure correspond à la structure intracellulaire de la cellule (réfringence du cytoplasme, morphologie, rapport nucléo-cytoplasmique). La mesure de **la lumière absorbée** évolue proportionnellement au diamètre de la cellule (supposée sphérique) et à l'indice d'absorption des constituants cellulaires. La **fluorescence** émise apportée à la cellule par un fluorochrome.

Concrètement, pour cette étude, la cytométrie en flux permet de donner 3 types d'informations sur les cellules (Maynadié, 2006) :

- Sa taille relative appelée Forward Scatter – FSC. Cette mesure correspond à la lumière diffractée aux petits angles. Elle est proportionnelle à la taille de la cellule et est détectée dans l'axe de la lumière incidente (Forward Light Detector), Figure 2.
- Sa granularité relative ou complexité interne représentée par le paramètre Side Scatter – SSC. Cette mesure correspond à la lumière diffractée aux grands angles. Elle est proportionnelle à la granularité et à la complexité de la cellule et est détectée à 90° par rapport à l'axe de la lumière incidente (Right Angle Light Detector), Figure 2.
- Son intensité relative de fluorescence, appelée FL1 à FL4 selon le laser utilisé. Elle est collectée à 90° par rapport au faisceau lumineux. Elle peut être une autofluorescence ou résulter d'un marquage par un ou plusieurs fluorochromes spécifiques de constituants cellulaires.



**Figure 2: Principe de mesure de la Cytométrie en flux et exemples d'histogramme et de cytogramme obtenus en CMF. L'histogramme montre le nombre de coups en fonction de l'intensité de fluorescence sur le premier laser (FL1-H). Le cytogramme représente la granularité (SSC-H) en fonction de la taille (FSC-H).**

Ces informations permettent de « trier » les cellules étudiées et donc de remonter à des concentrations cellulaires connaissant les volumes d'échantillons analysés. De plus l'utilisation de marqueurs spécifiques peut renseigner sur l'état physiologique des cellules, ce qui en fait une technique particulièrement puissante en microbiologie environnementale.



## ANNEXE 2 : Dosage des sucres (phenol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), d'après Masuko et al. (2005)

Préparer les dilutions de glucose pour la courbe standard entre 0 et 1 µg et entre 1 et 5 µg de glucose. Solution 100g/L faite à partir de 1g de glucose et 10mL H<sub>2</sub>O MQ (à filtrer sur 0.2µm). Conservation de la solution mère -20°C – 1 mois environ.

0.1g/L standard (µL)	Water (µL)	Glucose (µg)
0	100	0
10	90	0,1
20	80	0,2
30	70	0,3
40	60	0,4
50	50	0,5
60	40	0,6
70	30	0,7
80	20	0,8
90	10	0,9
100	0	1

1g/L standard (µL)	Water (µL)	Glucose (µg)
0	100	0
10	90	1
20	80	2
30	70	3
40	60	4
50	50	5
60	40	6
70	30	7
80	20	8
90	10	9
100	0	10

### Solution d'acide sulfurique :

Mettre 5mL d'acide sulfurique 95% dans falcon et dans la glace.

### Solution de phénol 5 % :

Dissoudre 1.25g de phénol dans 25mL d'H<sub>2</sub>O MQ (sous hotte chimique)

### Protocole :

- 1) Décongeler doucement les échantillons à RT
- 2) Allumer le bain sec à 90 °C (vérifier la température)
- 3) Préparer les standards
- 4) Vortexer les standards / échantillons (soit 3échantillons x triplicat = 9 tests) et transférer 100µl dans un µtube de 1.5mL
- 5) Placer les µtubes dans de la glace
- 6) Ajouter 150µL de la solution glacée H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 7) Ajouter 30µL de la solution de phénol 5%
- 8) Vortexer doucement
- 9) Placer les tubes 5min à 90°C
- 10) Refroidir les tubes – RT
- 11) Faire le blanc du spectro avec de l'eau MQ
- 12) Transférer l'ensemble dans une cuvette PMMA
- 13) Lecture à **490nm**

Avec les cuves PMMA, utiliser la même cuve pour toutes les mesures pour éviter les différences dues aux cuves.

**!! Une fois la mesure faite, jeter les échantillons dans poubelle liquide acide !!**

**Attention, les solutions utilisées étant fortement acides, elles dégraderont le papier essuie-tout utilisé au labo pour nettoyer la paillasse avec libération de sucres et risque de contamination et background. Donc, durant la manip, ne rien frotter avec de l'essuie-tout ! Travailler proprement et si pas, tout nettoyer une fois que la manip est terminée !!!**

### ANNEXE 3 : Dosage des protéines selon le protocole de Folin-Lowry (Lowry et al., 1951)

Préparer les dilutions de BSA pour la courbe standard entre 0 et 1µg et entre 0 et 5µg de BSA. Solution 1000g/L faite à partir de 1g de BSA et 1mL H<sub>2</sub>O MQ (à filtrer sur 0.2 µm).

0.1g/L standard (µL)	Water (µL)	BSA (µg)
0	100	0
10	90	0,1
20	80	0,2
30	70	0,3
40	60	0,4
50	50	0,5
60	40	0,6
70	30	0,7
80	20	0,8
90	10	0,9
100	0	1

0.5g/L standard (µL)	Water (µL)	BSA (µg)
0	100	0
10	90	0,5
20	80	1
30	70	1,5
40	60	2
50	50	2,5
60	40	3
70	30	3,5
80	20	4
90	10	4,5
100	0	5

#### Lowry A :

- 2g NaOH
- 10g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- 2.5g sodium tartrate
- 12.5g SDS ou 62.5mL SDS 20%
- Ajouter pour avoir 500mL de solution.

*NB : L'utilisation du potassium tartrate peut rendre le SDS insoluble. La solution se conserve 3 mois à température ambiante. Si elle devient trouble, refaire une nouvelle solution.*

Lowry B: 1% CuSO<sub>4</sub> – 5 H<sub>2</sub>O dans H<sub>2</sub>O MQ : 1g CuSO<sub>4</sub> dans 100 mL H<sub>2</sub>O MQ

Réactif de Lowry : A préparer le jour même.

50mL de A et 0.5mL de B ;

Réactif de Folin (Sigma F9252): (Conservation RT à préparer jour même)

Diluer à 1N avec un volume identique d'H<sub>2</sub>O MQ.

#### Protocole :

- 1) 100µL d'échantillon (soit 3échantillons x triplicat = 9 tests)
- 2) Ajouter 1mL de réactif de Lowry
- 3) Incuber 30min à température ambiante
- 4) Ajouter 100µL du réactif de Folin
- 5) Incuber 30min à température ambiante
- 6) Lire au spectro à **660nm**

**Absorbance à 660nm ou 750nm** si pas assez sensible (trop petites valeurs) à 660nm (cuve PMMA ; utiliser la même cuve pour toutes les mesures pour éviter les différences dues aux cuves).

## ANNEXE 4 : Caractéristiques du sable d'Hostun (données du fournisseur)



**SIKA**  
Une Société du Groupe SIFRACO  
Centre de production Hostun  
Quartier Les Merles 26730 Hostun  
Tel : 04 75 05 81 00 Fax : 04 75 48 85 57

**FICHE  
TECHNIQUE  
TYPE**

**Qualité : HN34**

Composition chimique type

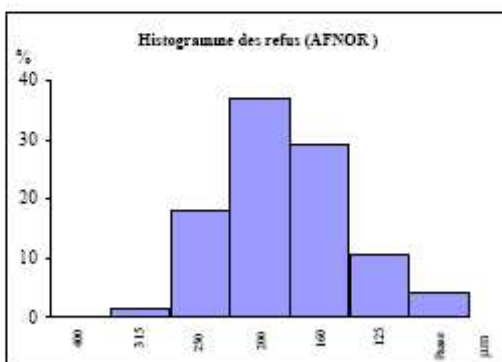
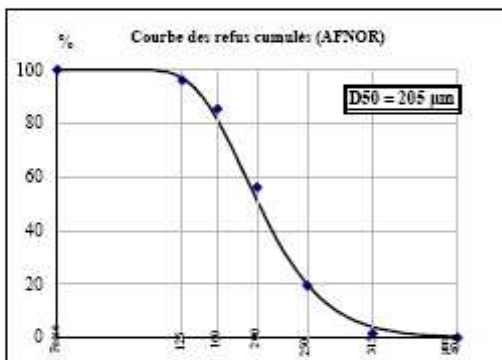
SiO <sub>2</sub>	sup. à	98,0 %
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	inf. à	0,15 %
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	inf. à	1,0 %
K <sub>2</sub> O	inf. à	0,7 %
CaO	inf. à	0,1 %

Caractéristiques physiques types

densité réelle (Pycnomètre)	2,65
dureté (Mohs)	7
pH	# 7,5
densité apparente sable sec ("Prolabo")	1,35
perte au feu (à 1000°C)	maxi 0,15 %
résistance pyroscopique (SFC ISO R528)	1750 °C

### GRANULOMETRIE MOYENNE STATISTIQUE

(% en masse - Valeurs indicatives)



### TAMISAGE AFNOR

ouverture des mailles µm	refus cumulé %
> 315	1,5
> 250	19,4
> 200	56,1
> 160	85,4
> 125	96,0
passé	4,0

Classe µm	refus par tamis %
> 315 µm	1,5
315-250 µm	17,9
250-200 µm	36,8
200-160 µm	29,3
160-125 µm	10,6
< 125 µm	4,0

R06 : 10003

## ANNEXE 5 : Modélisation du transfert de métaux (PhreeqC interactive)

### #Percolation Cd en colonnes

#### #Colonnes Aurélien

#TITLE Cd en colonnes

SOLUTION\_MASTER\_SPECIES

#Element species Alk gfw gfw\_of\_element  
#Cc Cc-1 0 121.14 121.14 # Site carboxyl sur Colloid

SURFACE\_MASTER\_SPECIES

#S\_b S\_b  
S\_si S\_siOH

SURFACE\_SPECIES

S\_siOH = S\_siOH ; log\_k 0.0 #surface-silice neutre  
S\_siOH - H+ = S\_siO- ; log\_k 6.3 #surface-silice -  
S\_siOH + Cd+2 - H+ = S\_siOCd+ ; log\_k 15 #surface-silice-zinc

##### Simulation 1 #####

SOLUTION 0-10

units mmol/kgw  
pH 6  
C(4) 1 CO2(g) -4.0  
end

SURFACE 1-10 # Surface adsorption in column cells

-equil 0  
-no\_edl  
S\_si 350e-6  
-no\_edl  
#S\_b 30E-5#  
-no\_edl  
END

END # prevent from selecting out (in file) the solution composition

##### Simulation 2 #####

# Bidest flushing Cd input

TRANSPORT # Flush column with bidest water prior entering metals

-cells 10  
-shifts 0 # 30  
-time\_step 1100  
-flow\_direction forward  
-boundary\_conditions flux flux  
-lengths 10\*0.015  
-dispersivities 10\*0.008  
-correct\_disp true  
-stagnant 0  
-warnings true  
-punch\_cells 10  
-print\_cells 10

```

SELECTED_OUTPUT
  -file out.sel
  -selected_out true
  -high_precision false
  -reset false
  -solution true
  -distance true
  -time true
  -step true
  -pH true
  -alkalinity false
  -totals Cd
  -molalities S_siO- S_siOH S_siOCd+

END
##### Simulation 3 : input of metals #####
PRINT ; -selected_output false # do not print solution 0 composition

SOLUTION 0 # defining metallic and bacterial input solution
  units mmol/kgw
  pH 6 # charge
  C(+4) 1 CO2(g) -4.0
  Cd 0.61
  N(+5) 1.22

PRINT ; -selected_output false # do not print solution 0 composition

END # prevents from printing the solution 0 composition
##### Simulation 4: Flush column with metallic+bacterial solution #####
PRINT ; -selected_output true

TRANSPORT ; -shifts 9.5 # 10 # créneau pendant 0.95 Vo
  -punch_cells 10 # imprimer toutes les cellules
END

##### Simulation 5 : Define bidest washing solution #####
PRINT ; -selected_output false

SOLUTION 0 # solution de bidest, pour pousser le créneau
  units mol/kgw
  pH 6.0 # charge
  C(4) 1 CO2(g) -4.0

END

##### Simulation 6 : Flush with washing solution #####
PRINT ; -selected_output true
TRANSPORT #
  -shifts 75 #40
END

TRANSPORT ; -shifts 0 # 10 # créneau pendant 1 Vo
  -punch_cells 1-10 # imprimer toutes les cellules
END

```

## ANNEXE 6 : Modélisation du transfert de métaux en présence de bactéries (PhreeqC interactive)

### #Percolation Bactéries et Cd en colonnes #Colonnes Aurélien

#TITLE Bactéries et Cd en colonnes

SOLUTION\_MASTER\_SPECIES

#Element species Alk gfw gfw\_of\_element  
Cc Cc-1 0 121.14 121.14 # Site carboxyl sur Colloid

SURFACE\_MASTER\_SPECIES

S\_b S\_b  
S\_si S\_siOH  
S\_bi S\_bi

SOLUTION\_SPECIES

#reaction acid-base des sites Cc#  
Cc-1 = Cc-1 ; log\_k 0  
Cc-1 + H+ = CcH ; log\_k 3.0 #!!! K-XH  
Cc-1 + Cd+2 = CcCd+ ; log\_k 6 ##### K-XZn constantes Zn-bacterie

SURFACE\_SPECIES

S\_b = S\_b ; log\_k 0.0  
S\_b + Cc-1 = S\_bCc-1 ; log\_k 3.3 ##### K-SX surface-coll\_carb-  
S\_b + Cc-1 + H+ = S\_bCcH ; log\_k 6.3 #!!! K-SXH = K-XH \* K-SX surface-coll\_carb-H  
S\_b + Cc-1 + Cd+2 = S\_bCcCd+ ; log\_k 9.3 ##### K-SXZn = K-XZn \* K-SX surface-coll\_carb-

S\_bi = S\_bi ; log\_k 0.0  
S\_bi + Cc-1 = S\_bicC-1 ; log\_k 12 ##### K-SX surface-coll\_carb-  
S\_bi + Cc-1 + H+ = S\_bicCcH ; log\_k 15 #!!! K-SXH = K-XH \* K-SX surface-coll\_carb-H  
S\_bi + Cc-1 + Cd+2 = S\_bicCcCd+ ; log\_k 18 ##### K-SXZn = K-XZn \* K-SX surface-coll\_carb-

S\_siOH = S\_siOH ; log\_k 0.0 #surface-silice neutre  
S\_siOH - H+ = S\_siO- ; log\_k 6.3 #surface-silice -  
S\_siOH + Cd+2 - H+ = S\_siOCd+ ; log\_k 15 #surface-silice-zinc

##### Simulation 1 #####

SOLUTION 0-10 # Define bidest flushing solution 0 and the 10 initial cell solutions

units mmol/kgw  
pH 6 # charge  
C(4) 1 CO2(g) -4.0  
end

SURFACE 1 # Surface adsorption in column cells

-equil 0 ; -no\_edl  
S\_si 350E-6  
-no\_edl  
S\_b 60E-5  
-no\_edl

S\_bi 30E-5  
-no\_edl  
END

SURFACE 2  
-equil 0 ; -no\_edl  
S\_si 350E-6  
-no\_edl  
S\_b 40E-5  
-no\_edl  
S\_bi 15E-5  
-no\_edl  
END

SURFACE 3  
-equil 0 ; -no\_edl  
S\_si 350E-6  
-no\_edl  
S\_b 25E-5  
-no\_edl  
S\_bi 10E-5  
-no\_edl  
END

SURFACE 4  
-equil 0 ; -no\_edl  
S\_si 350E-6  
-no\_edl  
S\_b 15E-5  
-no\_edl  
S\_bi 5E-5  
-no\_edl  
END

SURFACE 5  
-equil 0 ; -no\_edl  
S\_si 350E-6  
-no\_edl  
S\_b 10E-5  
-no\_edl  
S\_bi 2.5E-5  
-no\_edl  
END

SURFACE 6-9  
-equil 0 ; -no\_edl  
S\_si 350E-6  
-no\_edl  
S\_b 10E-5  
-no\_edl  
S\_bi 1E-5  
-no\_edl  
END

SURFACE 10  
-equil 0 ; -no\_edl  
S\_si 350E-6  
-no\_edl  
S\_b 10E-5  
-no\_edl

```

S_bi 1E-5
-no_edl
END

```

```

END # prevent from selecting out (in file) the solution composition
##### Simulation 1 #####
# Bidest flushing before bacteria and Zinc input

```

```

TRANSPORT # Flush column with bidest water prior entering metals
-cells 10
-shifts 0 # 30
-time_step 1100
-flow_direction forward
-boundary_conditions flux flux
-lengths 10*0.015
-dispersivities 10*0.008
-correct_disp true
-stagnant 0
-warnings true
-punch_cells 10
-print_cells 10

```

```

SELECTED_OUTPUT
-file out.sel
-selected_out true
-high_precision false
-reset false
-solution true
-distance true
-time true
-step true
-pH true
-alkalinity false
-totals Cd
-molalities CcH Cc- CcCd+ S_bCcH S_bCc- S_bCcCd+ S_biCcH S_biCc- S_biCcCd+ S_siO-
S_siOH S_siOCd+
END

```

```

##### Simulation 2 : input of metals #####
PRINT ; -selected_output false # do not print solution 0 composition

```

```

SOLUTION 0 # defining metallic input solution
units mmol/kgw
pH 6 # charge
C(+4) 1 CO2(g) -4.0
Cd 0.61
N(+5) 01

```

```

PRINT ; -selected_output false # do not print solution 0 composition

END

```

```

##### Simulation 3: Flush column with metallic+bacterial solution #####
PRINT ; -selected_output true

```

```

TRANSPORT ; -shifts 9.5 # 10 # créneau pendant 0.95 Vo
-punch_cells 10 # imprimer toutes les cellules
END

```



```

##### Simulation 4 : Define bidest washing solution #####
PRINT ; -selected_output false

SOLUTION 0 # solution de NaNO3, pour pousser le créneau
  units mol/kgw
  pH 6.0 # charge
  C(4) 1 CO2(g) -4.0
END

##### Simulation 6 : Flush with washing solution #####
PRINT ; -selected_output true
TRANSPORT # pousse NaNO3 pendant 24 Vo
  -shifts 69 #40
END

END # end bidest flushing simulation
##### Simulation 5 : input of bacteria #####
PRINT ; -selected_output false # do not print solution 0 composition

SOLUTION 0 # defining metallic and bacterial input solution
  units mmol/kgw
  pH 6 # charge
  C(+4) 1 CO2(g) -4.0
  Cc 0.2;

PRINT ; -selected_output false # do not print solution 0 composition

END

##### Simulation 6: Flush column with metallic+bacterial solution #####
PRINT ; -selected_output true

TRANSPORT ; -shifts 10 # 10 # créneau pendant 1 Vo
  -punch_cells 10 # imprimer cellule 10
END

##### Simulation 5 : Define bidest washing solution #####
PRINT ; -selected_output false

SOLUTION 0 # solution de NaNO3, pour pousser le créneau
  units mol/kgw
  pH 6.0 # charge
  C(4) 1 CO2(g) -4.0
END

##### Simulation 7 : Flush with washing solution #####
PRINT ; -selected_output true
TRANSPORT
  -shifts 40 #40
END

TRANSPORT ; -shifts 0 # 10 # créneau pendant 1 Vo
  -punch_cells 1-10 # imprimer toutes les cellules
END

```